ORSAY
Série A
N° d'ordre : 1077

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS SUD (XI)

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

RENÉE CHARRET

L'ADN MITOCHONDRIAL CHEZ TETRAHYMENA PYRIFORMIS : *CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE SA SYNTHÈSE ET DE SON RÔLE DANS LA BIOGENÈSE DES MITOCHONDRIES*

SOUTENUE LE 28 FEVRIER 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. ANDRÉ : Président

M. VIVIER

M. DROZ

M. MOUNOLOU

ORSAY
Série
N° d'ordre :

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS SUD (XI)

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

RENÉE CHARRET

L'ADN MITOCHONDRIAL CHEZ TETRAHYMENA PYRIFORMIS : *CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE SA SYNTHÈSE ET DE SON RÔLE DANS LA BIOGENÈSE DES MITOCHONDRIES*

SOUTENUE LE FÉVRIER 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. ANDRÉ : Président

M. VIVIER

M. DROZ

M. MOUNOLOU

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de Monsieur le Professeur E. FAURE-FREMIET

A Claude OGER qui fut mon ami

A mes parents

AVANT-PROPOS

Avant de rédiger cet avant-propos, je voudrais avoir une pensée pour celui qui m'avait fait l'amitié de s'intéresser à ce travail, Monsieur le Professeur FAURÉ-FREMIET dont le souvenir toujours vivant est attaché au laboratoire.

Il m'est agréable de remercier Monsieur le Professeur J. ANDRÉ de la confiance qu'il m'a accordé lorsqu'il m'a accueillie dans son jeune laboratoire. Le travail qu'il m'a confié a bénéficié de ses conseils, de ses critiques parfois sévères, toujours amicales. Pour tout cela, je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Ma gratitude va à Monsieur le Professeur E. VIVIER, qui est à l'origine de ma carrière ; ses encouragements étaient précieux pour la débutante d'alors. C'est une grande joie pour moi de la voir siéger à mon jury.

C'est grâce à Monsieur le Professeur B. DROZ que j'ai pu maitriser avec succès la technique d'autoradiographie au microscope électronique. Il m'est agréable de le remercier d'avoir accepté de participer à mon jury.

Je remercie Monsieur le Professeur J.C. MOUNOLOU de l'intérêt amical qu'il a porté à ce travail et de sa présence dans le jury.

Jean-Claude CLÉROT, Jean-Jacques CURGY, Roland PERASSO, confidents patients de mes réussites et de mes échecs, je vous remercie affectueusement pour votre perpétuelle bonne humeur et votre précieuse amitié.

Merci Barbara STEVENS, de m'avoir toujours amicalement aidée et fait bénéficier de votre expérience.

Mes remerciements vont également à Michel CHARLIER, du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, qui lors de son séjour dans le laboratoire a collaboré activement à la réalisation de certaines expériences. Notre collaboration a été assortie de nombreuses et fructueuses discussions.

Paul PERSONNE de la Faculté des Sciences d'Amiens m'a toujours apporté son aide et son amitié. Je l'en remercie bien vivement.

Je suis redevable aux techniciens du laboratoire pour leur aide amicale dans des taches variées et nombreuses. Je remercie plus particulièrement Claudette ROUX qui m'a secondée efficacement dans ce travail.

Jean-Claude RONCERAY a effectué le travail photographique avec compétence et complaisance, Cécile COUANON, la dactylographie, avec soin et gentillesse. Il m'est agréable de les remercier de leur aide dévouée.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548005_0017

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION 1

2. MATERIEL ET TECHNIQUES 7

2-1. SOUCHES ET CULTURES 7

2-1-1. Souches 7
2-1-2. Mode de culture 7
2-1-3. Temps de génération 8

2-2. PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 8

2-2-1. Fixation 8
2-2-2. Inclusion 8
2-2-3. Coupes et colorations 9
2-2-4. Digestions enzymatiques 9

2-3. AUTORADIOGRAPHIE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE 9

2-4. CALCULS STATISTIQUES 10

2-5. PREPARATION DES MITOCHONDRIES ISOLEES 10

2-6. VISUALISATION DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE DE KLEINSCHMIDT APRES LYSE DES MITOCHONDRIES 13

2-7. TECHNIQUE DE MILLER 15

2-8. EXTRACTION ET DOSAGE COLORIMETRIQUE 16

2-9. DOSAGE DES PROTEINES 16

2-10. MESURE DE RADIOACTIVITE DE L'ADN EXTRAIT PAR SCINTILLATION EN MILIEU LIQUIDE. 17

2-11. UTILISATION DU BROMURE D'ETHIDIUM 17

3. L'ADN MITOCHONDRIAL 18

3-1. LES MITOCHONDRIES DE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* 18

3-1-1. Dans la cellule 18
3-1-2. Mitochondries isolées 19

3-2. LOCALISATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL 20

3-3. QUANTITE D'ADN MITOCHONDRIAL 20

3-4. VISUALISATION DES MOLECULES D'ADN 22

3-4-1. Lyse des mitochondries par choc osmotique 22
3-4-2. Lyse des mitochondries par le désoxycholate de sodium. 24

3-5. DISCUSSION 24

3-5-1. Mitochondries 24
3-5-2. Quantité d'ADN mitochondrial 26
3-5-3. ADN isolé 27

4.SYNTHESE ET STABILITE DE L'ADN MITOCHONDRIAL 32

4-1. RADIOACTIVITE DES MITOCHONDRIES PRISES INDIVIDUELLEMENT

4-1-1. Incorporation de thymidine ^{3}H 33
4-1-2. Intensité du marquage en fonction du temps 33
4-1-3. Comparaison de la répartition des grains d'argent sur les mitochondries à une distribution de Poisson 33

4-2. INTENSITE DU MARQUAGE MITOCHONDRIAL EN FONCTION DU MARQUAGE DES NOYAUX 39

4-3. STABILITE DE L'ADN MITOCHONDRIAL 39

4-3-1. Maintien de la culture en phase exponentielle 42
4-3-2. Résultats 43

4-4. DISCUSSION 51

4-4-1. Validité des autoradiographies 51
4-4-2. Répartition de la radioactivité dans la population mitochondriale 53
4-4-3. Synthèse de l'ADN mitochondrial 55
4-4-4. Stabilité de l'ADN mitochondrial 57

5. QUELQUES ASPECTS DE LA FONCTION DE L'ADN MITOCHONDRIAL. 59

5-1. VISUALISATION DE LA TRANSCRIPTION ET DE LA TRADUCTION DANS LES MITOCHONDRIES 60

5-1-1. Résultats 60
5-1-2. Discussion 62

5-2. EFFET DU BROMURE D'ETHIDIUM 65

5-2-1. Résultats 65
5-2-1-1. Synthèse d'ADN et modifications des mitochondries 65
5-2-1-2. Isolement des mitochondries des cellules traitées et mesure de la longueur de leur ADN 65
5-2-1-3. Réversibilité 67

5-2-2. Discussion 67
5-2-2-1. Modifications mitochondriales 67
5-2-2-2. ADN des mitochondries des cellules traitées 68
5-2-2-3. Réversibilité 68

6. RESUME 72

BIBLIOGRAPHIE 76

1. INTRODUCTION

L'existence d'ADN hors du noyau est connue depuis longtemps : c'est en 1924, que Bresslau et Scremin ont montré que le kinétoplaste des Trypanosomes présente une réaction Feulgen positive. Cette observation les a amenés à conclure à l'existence dans cet organite d'un composé analogue à l'acide désoxyribonucléique du noyau. Le kinétoplaste est un peu oublié jusqu'à ce que Steinert et coll., en 1958, étudiant l'incorporation de thymidine ^{3}H chez *Trypanosoma mega*, montrent que, tout comme le noyau, il synthétise de l'ADN. Puis de nombreux travaux s'effectuent sur différentes espèces de Trypanosomes et mettent en évidence l'association du kinétoplaste à la mitochondrie, association qui se manifeste par une continuité des membranes des deux organites (Meyer et coll., 1958 ; Steinert et coll., 1958 ; Clark et Wallace, 1960 ; Steinert, 1960).

S'agissant de Métazoaires, l'ADN extranucléaire est signalé pour la première fois par Hoff-Jorgensen et Zeuthen (1952) qui trouvent dans les oeufs de crapaud 5000 fois plus d'ADN dans le cytoplasme que dans le noyau. Chèvremont et ses collaborateurs (1961) constatent que les mitochondries de fibroblastes de poulet soumis à des chocs thermiques ou traités par une désoxyribonucléase acide deviennent Feulgen positives (Baeckeland et coll., 1957).

Ces travaux de l'école de Chèvremont ouvrent la voie à de nombreux autres qui apportent la preuve, avec la microscopie électronique, de l'existence d'ADN dans les mitochondries et les chloroplastes. Dans des cellules normales, ces organites ne présentent généralement pas de réaction Feulgen positive, exception faite pour les chloroplastes de *Chlamydomonas* où Ris et Plaut (1962) mettent en évidence des

fibrilles de 25 Å. A la même époque, Nass et Nass (1962), dans des mitochondries de cellules de Vertébrés, Ris (1962), dans des proplastes et des mitochondries d'algues, ou dans des kinétoplastes, décrivent des amas de fibrilles qui ont la même morphologie que le nucléoïde bactérien (Kellenberger et coll., 1958). Les digestions enzymatiques à la DNase confirment qu'il s'agit bien d'ADN. De nombreux travaux suivent alors ceux de Nass et ceux de Ris (Nass et Nass,1963a,b; Swift et coll., 1964 ; Kislev et coll., 1965 ; Nass et coll., 1965a ; Leduc et coll., 1966, etc... revues par Borst et coll., 1967 ; Granick et Gibor, 1967 ; Roodyn et Wilkie, 1968 ; Borst et Kroon, 1969 ; Nass, 1969 ; Swift et Wolstenholme, 1969 ; Rabinowitz et Swift, 1970 ; Borst, 1972). La visualisation directe de l'ADN dans les mitochondries est ainsi venue lever le doute qui entourait les travaux des biochimistes. Il est montré que l'ADN trouvé dans les fractions mitochondriales n'est pas une contamination nucléaire mais bien un constituant proprement mitochondrial.

Cet ADN a une composition en bases différente de celle de l'ADN nucléaire. Mise en évidence tout d'abord pour l'ADN chloroplastique (Chun et coll., 1963 ; Sager et Ishida, 1963 ; Braverman et Einsenstaat, 1964), cette différence caractérise également l'ADN des mitochondries d'organismes variés, des Champignons (Luck et Reich, 1964) aux Vertébrés (Rabinowitz et coll., 1965 ; revue par Swift et Wolstenholme, 1969).

Les travaux s'orientent alors vers l'obtention de molécules d'ADN mitochondrial dépourvu de contamination nucléaire, et c'est en 1966, que sont publiées les premières images de molécules circulaires d'ADN mitochondrial (Nass, 1966 ; Sinclair et Stevens, 1966 ; Van Bruggen et coll., 1966). On constate rapidement que dans une grande variété d'organes et d'espèces de Vertébrés, ces molécules offrent une homogénéité de forme (circulaire) et de taille (5 µ). Mais

cette loi n'est pas générale. Chez le levure *Saccharomyces cerevisiae*, Hollenberg et coll. (1969) montrent quelques molécules circulaires de 25 µ et chez *Neurospora crassa*, Clayton et Brambl (1972) et Agsteribbe et coll. (1972) trouvent des cercles de 20 µ. Enfin, chez de nombreux organismes il n'a pas été vu de molécules circulaires mais seulement des molécules linéaires : molécules de 15 µ à 17 µ chez *Tetrahymena pyriformis* (Suyama et Miura, 1968 ; Charret, 1970) de 20 µ environ chez *Phaseolus vulgaris* (Wolstenholme et Gross, 1968) de quelques µ à 12 µ chez *Physarum polycephalum* (Evans et Suskind, 1971).

L'ADN mitochondrial possède des caractéristiques si différentes de celles de l'ADN nucléaire qu'un certain nombre de questions se posent, notamment sur le lieu et le déroulement de sa synthèse au cours du cycle cellulaire. Il peut être synthétisé, soit dans le noyau d'où il serait ensuite exporté vers les mitochondries, soit *in situ* dans la mitochondrie à des périodes déterminées du cycle cellulaire.

L'incorporation de thymidine ^{3}H dans des mitochondries isolées indique que ces dernières sont capables d'effectuer elles-mêmes, en l'absence du noyau, une synthèse d'ADN (Haldar et coll., 1966 ; Wintersberger, 1966 ; Brewer et coll., 1967 ; Parsons et Simpson, 1967 ; 1968 ; Wintersberger, 1968 ; Kalf et coll., 1971). De plus, la mise en évidence d'une ADN-polymérase mitochondriale distincte de celle du noyau et localisée à l'intérieur de la mitochondrie (Kalf et Ch'ih, 1968 ; Meyer et Simpson, 1968 ; Iwashima et Rabinowitz, 1969 ; Wintersberger et Wintersberger, 1970a ; 1970b) renforce considérablement l'idée que la mitochondrie synthétise *in situ* un ADN, car il s'agit bien d'une réplication d'ADN et non d'un processus de restauration (Karol et Simpson, 1968 ; Gross et Rabinowitz, 1969) ; c'est une réplication de type semi-conservatif (Gross et Rabinowitz, 1969).

Les modalités de la synthèse de l'ADN mitochondrial font encore l'objet de quelques discussions mais on s'accorde,

dans la plupart des cas, à penser que cette synthèse n'est pas synchronisée avec celle de l'ADN nucléaire et qu'elle est généralement continue durant tout le cycle cellulaire (Parsons, 1965, Charret et André, 1968, chez *Tetrahymena pyriformis*, Reich et Luck, 1966, chez *Neurospora crassa*, Evans, 1966, Guttes et Guttes, 1964, Guttes et coll., 1967, Braun et Evans, 1969, chez *Physarum polycephalum*, Williamson et Moustacchi, 1971, chez *Saccharomyces cerevisiae*, Pica-Mattoccia et Attardi, 1972, chez HeLa). Cependant, tout en constatant aussi une indépendance chronologique entre les deux systèmes de réplication, Smith et coll. (1968) caractérisent une phase S mitochondriale chez *Saccharomyces lactis*. Chez *Trypanosoma mega*, il y a aussi une phase S pour le kinétoplaste et ici la synchronisme de la synthèse de l'ADN kinétoplastique et celle de l'ADN nucléaire est parfaite (Steinert et Steinert, 1962). En ce qui concerne *Tetrahymena pyriformis*, Parsons (1965) trouve une synthèse d'ADN mitochondrial pendant tout le cycle cellulaire mais note une augmentation du marquage des mitochondries pendant la phase S macronucléaire. C'est aussi ce que signale Cameron (1966). Par contre, nous avons montré, dans le processus expérimental que nous avons employé, que l'intensité du marquage mitochondrial ne diffère pas selon que les noyaux sont en phase S, G_1 ou G_2 (Charret et André, 1968).

Dans la mesure où cet ADN mitochondrial était susceptible de constituer une source d'information génétique autre que celle fournie par le noyau, il fallait savoir si l'ARN mis en évidence dans les mitochondries provenait du fonctionnement des gènes mitochondriaux. Des expériences d'hybridation ont montré que l'ARN mitochondrial s'hybride avec l'ADN mitochondrial au contraire de l'ARN cytoplasmique (Wood et Luck chez *Neurospora crassa*, 1969, Fukuhara chez la levure, 1967, Suyama chez *Tetrahymena*, 1967). Et l'on sait actuellement qu'il y a deux gènes qui assurent la transcription des deux ARN ribosomaux, et 10 à 15 gènes qui assurent celle

d'ARN de transfert mitochondriaux (Suyama, 1969 ; Aloni et Attardi, 1971a ; 1971b ; Dawid, 1972). Ces gènes mis à part, la molécule d'ADN mitochondrial est suffisamment longue pour contenir encore l'information nécessaire à la synthèse de quelques protéines. Il est admis que certaines protéines de la membrane interne sont de traduction mitochondriale, et récemment quelques unes d'entre elles ont été identifiées. Il s'agit d'un polypeptide de poids moléculaire 28 000, parmi les 6 polypeptides constituant l'apoenzyme de la cytochrome oxydase (Weiss et coll., 1971 ; Weiss, 1972a), d'un polypeptide de poids moléculaire 32 000 parmi les 3 sous-unités protéiques du cytochrome b (Weiss, 1972b). Tzagoloff et Meagher (1972) ont également montré que les 4 protéines du facteur membranaire (membrane factor) du complexe ATPase sensible à la rutamycine sont de traduction mitochondriale. Les autres éléments de ce complexe localisé dans la mitochondrie, le facteur F1 et la protéine conférant la sensibilité à l'oligomycine (OSCP) sont eux de traduction cytoplasmique. La mitochondrie doit au fonctionnement de gènes nucléaires de pouvoir édifier et rendre fonctionnel la cytochrome oxydase, le cytochrome b et le complexe ATPase sensible à la rutamycine.

L'intérêt suscité par l'ADN mitochondrial, intérêt dû à sa localisation, à ses caractéristiques et à son rôle possible nous a incitée à en entreprendre l'étude chez *Tetrahymena pyriformis* qu'il est aisé de cultiver axéniquement ; ces cultures sont réalisables en faible volume pour les expériences d'autoradiographie ou en grande quantité pour la préparation de l'ADN mitochondrial. Les techniques utilisées sont variées et parallèles à des observations au microscope électronique. Ces dernières représentent l'essentiel de notre travail qui comprend trois parties :

Dans la première partie, surtout morphologique, nous montrons la présence d'ADN dans les mitochondries et apportons des précisions sur la taille et la forme des molécules.

Dans la deuxième partie, nous étudions la chronologie de sa synthèse au cours du cycle cellulaire (publication 1) et nous suivons la dilution de la radioactivité au cours de plusieurs générations cellulaires après marquage initial, afin de rechercher s'il existe ou non un renouvellement de l'ADN mitochondrial.

Dans la troisième partie, nous tentons de montrer quelques aspects de la fonction de l'ADN mitochondrial. Tout d'abord, nous cherchons à visualiser la transcription et la traduction dans les mitochondries. Puis nous observons l'action du bromure d'éthidium ; l'inhibition de la synthèse de l'ADN mitochondrial, les modifications des mitochondries et l'augmentation de leur nombre nous ont amenée à discuter le rôle de l'ADN mitochondrial dans l'élaboration des membranes internes (publication 2).

2. MATERIEL ET TECHNIQUES

2-1. SOUCHES ET CULTURES.

2-1-1. Souches.

Trois souches de *Tetrahymena pyriformis* sont utilisées :

- souche micronucléée : Variété I, Type-conjugant 1, ou souche 1, donnée par notre regretté ami Claude Oger.
- souches amicronucléées : GL en provenance de la collection d'algues et de Protozoaires de Cambridge.
  : ST, obligeamment donnée par le Dr. Suyama.

2-1-2. Mode de culture.

Les Ciliés sont cultivés à 28°C de façon axénique dans un milieu à 1,5 % de protéose-peptone Difco enrichi ou non par 0,25 % d'extrait de levure Difco et stérilisé à 120°C pendant 30 minutes (Plesner et coll., 1964). Le milieu non enrichi a été utilisé pour les souches 1 et GL, le milieu enrichi pour la souche ST. Les cultures stock sont faites sur 50 ml de milieu ; elles sont repiquées toutes les deux semaines environ.

Nos cultures, qui ne sont ni aérées, ni agitées, sont faites dans des récipients suffisamment grands pour que le milieu se trouve réparti sur une faible épaisseur. Le maintien d'une culture en phase de croissance exponentielle se fait par repiquage quotidien sur 5 à 10 ml de milieu en tube à essais de 25 ml, ou sur 50 à 100 ml en erlenmeyers de 150 à 250 ml. Les cultures en masse sont faites sur 1 à 2 litres de milieu en erlenmeyers de 6 litres. Les repiquages sont toujours effectués à partir de cultures de 24 heures.

2-1-3. Temps de génération.

La croissance des cultures est suivie par comptage au compteur Coultronic. Les temps de génération des souches GL et 1 sont de l'ordre de 6 à 7 heures pour des cultures en tubes à essais contenant 10 ml de milieu ; celui de la souche ST est de 3 heures 30, pour des cultures en flacon de 250 ml contenant 50 ml de milieu, de 5 heures, pour des cultures en masse en flacon de 6 litres avec 2 litres de milieu.

2-2. PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

2-2-1. Fixation.

Les Ciliés sont rassemblés par centrifugation ; le surnageant est enlevé à la pipette et le culot est remis en suspension dans du fixateur. Ces opérations sont répétées une fois.

Les modes de fixation sont les suivants :

- glutaraldéhyde à 0,25 % dans un tampon phosphate 0,05 M pendant 20 minutes, suivie de l'acide osmique à 2 % dans le même tampon pendant une heure ; la fixation osmique peut être précédée d'un lavage avec le tampon ;
- glutaraldéhyde à 0,25 % dans un tampon phosphate 0,05 M pendant une heure ;
- acide osmique à 2 % dans un tampon phosphate 0,05 M pendant une heure ;
- mélange de Dalton (1955) modifié par Stockem (1968) pendant 30 minutes à une heure ;
- formol à 10 % dans un tampon phosphate 0,05 M pendant une heure ; cette fixation est destinée aux digestions à la DNase de cellules entières.

2-2-2. Inclusion.

Après la fixation, les cellules sont lavées dans le tampon phosphate 0,05 M et préincluses dans un caillot de

fibrine (Charret et Fauré-Fremiet, 1967). Les préinclusions sont alors déshydratées à l'alcool et à l'oxyde de propylène puis incluses en Epon.

2-2-3. Coupes et colorations.

Les coupes sont réalisées au couteau de diamant et contrastées par l'acétate d'uranyle en solution saturée dans l'eau ou en solution à 2,5 % dans l'alcool 50°. La coloration à l'acétate d'uranyle est suivie d'une coloration au citrate de plomb selon Reynolds (1963). La coloration à l'hydroxyde de plomb selon Karnovsky (1961) est utilisée après une fixation simple à la glutaraldéhyde.

2-2-4. Digestions enzymatiques.

La technique de digestion à la DNase est celle de Swift et coll. (1964). Les digestions à la pronase sont faites selon la technique de Monneron et Bernhard (1966) sur des coupes de cellules fixées à la glutaraldéhyde et à l'acide osmique et incluses en Epon.

2-3. AUTORADIOGRAPHIE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

La technique d'autoradiographie au microscope électronique est celle de Droz (1967) et de Larra et Droz (1970). La thymidine tritiée d'activité spécifique de 9,7 à 25 Ci/mM, est ajoutée aux cultures à raison de 100 à 200 µCi/ml. La dose relative à chaque autoradiographie, courbe, histogramme ou tableau est précisée dans la légende correspondante. Les temps d'exposition varient de 3 à 5 semaines.

Les grains d'argent qui se trouvent situés en totalité ou en partie au-dessus d'un profil mitochondrial ont été dénombrés. Les grains situés au coeur de la mitochondrie sont dus à une source radioactive de localisation mitochondriale ; ceux qui sont situés au voisinage de l'enveloppe ont une origine

indéterminée qui peut être le cytosol tout comme la mitochondrie. Etant donné le nombre extrêmement réduit de grains dans le cytosol, les grains situés en partie sur l'enveloppe mitochondriale ont été considérés comme dûs à une source radioactive mitochondriale.

2-4. CALCULS STATISTIQUES

La comparaison de la répartition des grains d'argent sur les mitochondries avec une distribution de Poisson est un test qui permet de savoir si les grains d'argent sont, ou non, distribués au hasard sur les mitochondries. Si les mitochondries sont toutes équivalentes dans leur aptitude à devenir marquées, et si le nombre moyen de grains par mitochondrie est m, la probabilité P_g de trouver g grains sur une mitochondrie est donnée par la relation suivante :

$$P_g = \frac{m^g e^{-m}}{g!}$$

(Van Tubergen et Setlow, 1961 ; Luck, 1963a ; Parsons et Rustad, 1968).

On calcule le nombre théorique de mitochondries à 0, 1, 2, ou 3 grains, et on fait l'histogramme des valeurs obtenues que l'on compare à l'histogramme des nombres observés.

Les tests statistiques de comparaison des valeurs observées et des valeurs théoriques dans le cas d'une distribution de Poisson, ainsi que ceux des pourcentages, ont été effectués par la méthode du χ^2 de Pearson, le seuil de signification adopté étant le seuil habituel de 5 %.

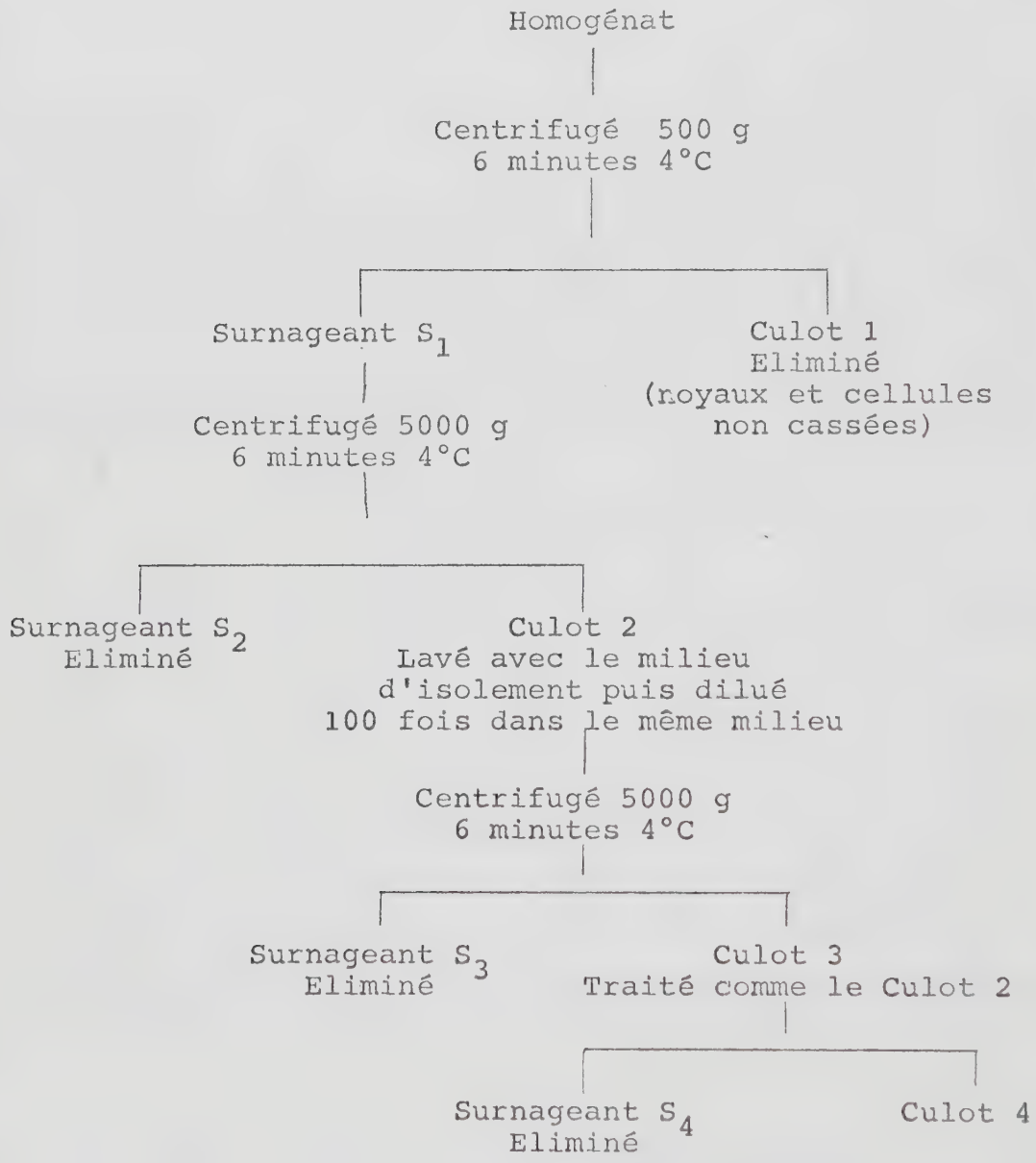
2-5. PREPARATION DES MITOCHONDRIES ISOLEES

Seule la souche ST permet l'isolement facile de

mitochondries (Suyama, 1966). La méthode utilisée pour la préparation des mitochondries est celle de Suyama et Preer (1965). Les cellules sont rassemblées avec une centrifugeuse GGT (1700 t/minute pendant 5 minutes). Cette centrifugeuse présente l'avantage de posséder des tubes de 150 ml rétrécis dans leur partie inférieure, ce qui facilite la collecte des Ciliés vivants.

Le milieu de culture est éliminé. Il est remplacé par la solution d'isolement, qui est une solution de raffinose 0,2 M dans un tampon phosphate de potassium 1 mM, pH 6,2, à laquelle on ajoute 0,25 % de sérum albumine de boeuf. Les cellules sont remises en suspension dans cette solution pour un lavage, elles sont centrifugées comme précédemment à 1700 t/minute pendant 5 minutes ; le culot obtenu est dilué 10 fois dans la solution d'isolement et broyé à 4°C avec un homogénéiseur à lait. Sur l'homogénat ainsi obtenu, on pratique ensuite les opérations décrites dans le tableau ci-contre :

Schéma d'isolement des mitochondries



Le culot 4 est remis en suspension dans 10 fois son volume de raffinose 0,2 M, $MgCl_2$ 0,002 M et DNase 100 µg/ml pendant 30 minutes à 4°C. Pour arrêter l'action de la DNase, on ajoute un volume égal de solution d'isolement contenant de l'EDTA 0,02 M. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, le culot est remis en suspension dans 100 fois son volume de solution d'isolement sans EDTA et centrifugé de nouveau ; ce lavage est répété deux fois.

Le culot de mitochondries obtenu après le traitement à la DNase est prêt à être utilisé pour la fixation et l'étude morphologique, pour la lyse et la visualisation de l'ADN par la technique de Kleinschmidt, pour la visualisation de la transcription par la technique de Miller, pour l'extraction de l'ADN et son dosage colorimétrique. Il est, selon le cas, remis en totalité en suspension dans la solution d'isolement, cette suspension étant ensuite complétée à 5 ml ou 10 ml, ou fractionné. Dans ce dernier cas, nous avons choisi une quantité empirique du culot qui nous sert à mesurer les quantités de mitochondries avec une précision suffisante pour les opérations subséquentes. Cette quantité empirique est la fraction de culot prélevée à l'aide d'une boucle de platine de 2,5 mm de diamètre. Suspendue dans 9 gouttes d'une solution elle nous donne des mitochondries que nous disons "diluées 10 fois". C'est cette dilution que nous utiliserons le plus couramment.

2-6. VISUALISATION DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE DE KLEINSCHMIDT APRES LYSE DES MITOCHONDRIES.

Nous pratiquons la technique de Kleinschmidt modifiée par Freifelder et Kleinschmidt (1965) sur des mitochondries lysées par choc osmotique ou par le désoxycholate de sodium.

Lyse par choc osmotique (Nass, 1966 ; Van Bruggen et coll., 1968) après incubation en acétate d'ammonium.

Deux paramètres interviennent dans la lyse des mitochondries par choc osmotique.

- La concentration en acétate d'ammonium : plus elle est élevée, plus les mitochondries éclatent brutalement lors de leur remise en contact avec l'eau. Nass emploie 4 M, Van Bruggen 4 à 8 M.

- La durée d'incubation dans l'acétate d'ammonium. Nous avons utilisé les mitochondries soit immédiatement, soit après 15 minutes, soit après 45 minutes d'attente dans l'acétate d'ammonium. Etant donné la complexité de la mitochondrie de *Tetrahymena*, l'équilibre de la concentration ionique entre l'intérieur de la mitochondrie en chacun de ses points et le milieu extérieur ne doit être atteint qu'après un certain délai. Cet équilibre est nécessaire pour que l'éclatement de la mitochondrie se fasse régulièrement lors du choc osmotique ultérieur.

Les variations de ces deux paramètres influent sur la dispersion de l'ADN et font que nous obtenons des molécules très enchevêtrées ou au contraire bien séparées les unes des autres.

Les mitochondries sont, selon notre convention, diluées 10 fois dans l'acétate d'ammonium 4 M ou 8 M, et laissées ou non en attente à 4°C (voir légendes des figures), avant d'être mélangées à une quantité égale d'une solution aqueuse de cytochrome c à 0,02 %. Une goutte du mélange est immédiatement étalée sur l'eau à 4°C. La concentration d'acétate d'ammonium a été abaissée à 2 M pour les mitochondries à crêtes raréfiées et à matrice peu encombrée des cellules traitées au bromure d'éthidium.

Lyse par le désoxycholate de sodium.

Les mitochondries sont diluées 10 fois dans une solution d'EDTA (EDTA 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 8, Suyama et Preer, 1965), puis on ajoute 1 goutte de désoxycholate de sodium à 5 %. Le lysat obtenu est dilué avec du cytochrome c, de l'acétate d'ammonium et du formol, de telle sorte que la

solution finale soit composée de 30 % environ de lysat mitochondrial dans une solution de cytochrome c à 0,01 % et d'acétate d'ammonium 1 M, contenant 0,5 % de formol. Cette préparation est étalée sur une solution d'acétate d'ammonium 0,3 M contenant 0,5 % de formol.

Quel que soit le processus de lyse utilisé, l'ADN et les mitochondries lysées sont prélevés sur des grilles de maille 200, préalablement recouvertes d'une membrane de formvar et carbonées ; le prélèvement peut se faire soit immédiatement après l'étalement, soit après 15 à 20 minutes sans que l'on constate une différence entre les préparations. Les grilles sont séchées par immersion rapide dans l'alcool absolu, puis dans l'acétate d'isoamyle. Elles sont ombrées par ombrage rotatif à l'oxyde d'uranium ou par ombrage bidirectionnel au platine.

2-7. TECHNIQUE DE MILLER.

La technique imaginée par Miller et Beatty (1969) pour visualiser le fonctionnement des gènes nucléolaires et la transcription et la traduction dans les Bactéries (Miller et coll., 1970) est appliquée à des mitochondries isolées.

Les mitochondries sont diluées 20 fois dans la solution d'isolement, puis éclatées par choc osmotique par une dilution à 50 fois dans de l'eau ajustée à pH 9 avec de la soude 1 N. Les phases suivantes de la technique sont identiques à celles utilisées par Miller et coll. (1970) pour les Bactéries. Cette technique consiste en une courte centrifugation de la suspension de mitochondries à travers un coussin de sucrose ; au cours de cette opération, l'ADN est adsorbé sur le film de carbone qui recouvre la grille porte-objet, placée au fond du tube de centrifugation. Les grilles sont rincées dans l'eau, puis dans le Photo-Flo (Kodak) et colorées positivement à l'acétate d'uranyle et à l'acide phosphotungstique comme l'indique Miller.

2-8. EXTRACTION ET DOSAGE COLORIMETRIQUE DE L'ADN

L'ADN est extrait du culot de mitochondries par l'acide trichloracétique (ATC). La même opération est menée parallèlement sur le culot de noyaux et de cellules non brisées (C_1). Dans un premier temps, le culot est lavé avec 10 ml d'alcool 70° pendant quelques minutes, délipidé pendant 5 minutes à 60°C dans un mélange alcool éthylique-éther 3/1 (V/V), lavé avec 10 ml d'ATC à 5 % à 0°C pendant environ 5 minutes pour enlever la fraction acido-soluble. Chacune de ces opérations est effectuée deux fois, le culot étant chaque fois remis en suspension puis centrifugé 5 minutes à 5000 g et les surnageants éliminés. Dans un deuxième temps, le culot est suspendu dans 2 ml d'ATC à 5 %, et maintenu à 100°C pendant 20 minutes en tube bouché. L'ADN extrait par l'ATC, se trouve dans le surnageant qui est recueilli après une centrifugation de 10 minutes à 6000 g. Ce surnageant est conservé. On répète l'opération sur le culot restant. Les deux surnageants sont réunis et complétés à 5 ml avec de l'ATC à 5 %. L'ADN dissous est dosé selon la technique de Burton (1956) basée sur le dosage du désoxyribose par la diphénylamine. L'absorption est lue à 600 µm. Une solution de concentration connue d'ADN de thymus de veau sert de référence.

2-9. DOSAGE DES PROTEINES.

Le culot de mitochondries est remis en suspension dans la solution d'isolement et la suspension est complétée à 10 ml. Les protéines sont dosées sur 1 ml de cette suspension selon la technique de Lowry et coll. (1951). L'absorption est lue à 750 µm. Une solution de concentration connue de sérum-albumine de boeuf sert de référence. Une correction est apportée aux résultats finaux, pour tenir compte de la présence de sérum-albumine dans le milieu d'isolement.

2-10. MESURE DE RADIOACTIVITE DE L'ADN EXTRAIT PAR SCINTILLATION EN MILIEU LIQUIDE.

Le liquide scintillant a la composition suivante : 2 volumes de toluène contenant 0,5 % de PPO et 0,05 % de POPOP, 1 volume de triton X 100. A 15 ml de liquide scintillant on ajoute 1 ml d'ADN en solution dans l'ATC. Les mesures de radioactivité sont effectuées sur un spectromètre à scintillation Intertechnique. Elles sont exprimées en cpm rapportées à des µg d'ADN.

2-11. UTILISATION DU BROMURE D'ETHIDIUM.

Le processus d'utilisation du colorant, les calculs utilisés pour mesurer les surfaces et les volumes des mitochondries sont exposés dans une publication en annexe (Charret, 1972). Dans les expériences exposées dans cette publication, le bromure d'éthidium a été ajouté en même temps que la thymidine ^{3}H, au moment du repiquage des cultures. Dans le présent travail le colorant est ajouté aux cultures au moment du repiquage, à raison de 20 µg/ml, puis éliminé par centrifugation des cultures de cellules qui ont été traitées 6 à 12 heures. Les cellules sont alors remises en culture dans un milieu frais en présence de thymidine ^{3}H pendant 6 heures. Elles sont fixées et préparées pour l'autoradiographie.

3. L'ADN MITOCHONDRIAL

On sait que l'ADN existe dans les mitochondries de tissus variés d'Invertébrés et de Vertébrés. Chez les Protozoaires, outre la localisation d'ADN dans le kinétoplaste de certains Flagellés, il a été montré une incorporation de thymidine ^{3}H dans le cytoplasme d'*Amoeba proteus* (Plaut, 1958). Chez *Tetrahymena pyriformis*, Scherbaum (1960) signale le premier par autoradiographie, la présence d'ADN hors du noyau, Parsons et Dickson (1965) le détectent biochimiquement, Suyama et Miura (1968) en isolent les molécules. Swift (1965) et Sinclair (1966) sont les seuls à avoir montré les fibrilles condensées telles qu'on les observe dans un bon nombre de mitochondries après une fixation simple au tétroxyde d'osmium.

Dans ce chapitre, sera envisagé la mise en évidence de l'ADN mitochondrial, sa localisation cytologique, la morphologie de ses molécules isolées et la quantité d'ADN soit par mitochondrie, soit par quantité de protéines mitochondriales.

3-1. LES MITOCHONDRIES DE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

3-1-1. Dans la cellule

Dans des cellules en phase exponentielle de croissance, les mitochondries sont situées en majorité à la périphérie de la cellule (fig. 1). Dans les cellules en phase stationnaire les mitochondries quittent leur position périphérique et se dispersent dans le volume cytoplasmique (Elliott et Coll., 1966). Leur disposition particulière dans les cellules en phase exponentielle de croissance permet d'évaluer leur nombre en les comptant au microscope à contraste interférentiel dans la bande de cytoplasme comprise

entre deux cinéties voisines où l'on trouve, visibles sous le cortex, 45 à 60 mitochondries. Nous avons compté de 18 à 20 cinéties chez *Tetrahymena pyriformis*. Ces résultats sont en accord avec les données de Loefer et Coll. (1966) qui font état de 15 à 25 cinéties chez ce Cilié. Ceci nous permet d'estimer à 800 à 1200 le nombre de mitochondries par cellule. C'est une estimation approximative car nous ne tenons pas compte avec cette technique des quelques mitochondries qui sont loin du cortex.

Les crêtes sont nombreuses (fig.2) et la matrice peu abondante. Sur la membrane interne on observe de nombreux ribosomes sur lesquels nous reviendrons ultérieurement (fig.2). De plus, tout particulièrement dans les mitochondries de la souche ST, on constate l'existence dans la matrice d'inclusions denses aux électrons et homogènes d'aspect, d'environ 700 Å de diamètre et 0,2 µ de long (fig.3). Elles sont plus grosses dans les cellules en phase stationnaire que dans des cellules en phase exponentielle de croissance (fig.4). Un traitement à la pronase de cellules incluses en Epon fait disparaître ces inclusions et met ainsi en évidence leur nature protéique (fig.5).

3-1-2. Mitochondries isolées

L'isolement des mitochondries est facile avec la souche ST, alors qu'il est très difficile avec les souches 1 et GL. Avec ces dernières, le culot 2 est petit et surmonté d'une épaisse couche visqueuse. Il est impossible de séparer les mitochondries de ce matériel avec la technique ci-dessus. La réaction de Thiéry pour la mise en évidence du glycogène (1967) montre que le cytoplasme des souches 1 et GL est beaucoup plus riche en glycogène que la souche ST (fig. 6 et 7); c'est probablement pour cette raison qu'il est plus facile de séparer les mitochondries de la souche ST que des autres souches.

L'examen au microscope électronique des coupes de culots montre qu'ils sont dépourvus de contamination nucléaire,

c'est à dire de fragments de noyaux. Ils ont été traités à la DNase afin d'éliminer l'ADN nucléaire qui pourrait être adsorbé sur les membranes mitochondriales, utilisant le fait connu que la DNase ne pénètre pas dans la mitochondrie en bon état de conservation (Luck et Reich , 1964).

Sur coupes, les mitochondries isolées se présentent sous trois aspects; les unes dont la membrane externe est souvent arrachée sont gonflées avec peu de crêtes et une matrice claire, d'autres dont l'espace intermembranaire est dilaté sont contractées avec des crêtes serrées et une matrice dense aux électrons, d'autres enfin présentent un aspect intermédiaire (fig.8). De telles différences n'ont jamais été constatées dans des cellules entières.

3-2. LOCALISATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL.

Il est d'observation courante qu'une fixation qui préserve bien la structure de la cellule et en particulier celle des mitochondries ne convient pas pour visualiser l'ADN mitochondrial. Après une fixation à l'acide osmique seul, on voit dans la matrice mitochondriale un amas de fibrilles condensées (fig. 9 et 10). Ces amas sont également bien visibles après une fixation avec le mélange de Dalton, mélange qui conserve encore moins bien les structures que l'acide osmique seul (fig.11). On observe de fins filaments qui s'écartent de l'amas compact (fig. 10 et 11). Sur coupes de mitochondries isolées, ces filaments relient entre eux les amas de fibrilles condensées. L'ensemble, filaments et fibrilles condensées constitue un nucléoide analogue au nucléoide bactérien (fig.12).

3-3. QUANTITE D'ADN MITOCHONDRIAL

L'ADN mitochondrial est extrait, par l'ATC, de culots de mitochondries traités à la DNase à partir de cultures

en phase exponentielle de croissance et de cultures en phase stationnaire. Il est dosé par colorimétrie. Les quantités d'ADN sont rapportées aux quantités de protéines. Les résultats obtenus après 8 expériences sont rassemblés dans le tableau 1.

Expériences	Phase de croissance exponentielle	Phase stationnaire
1	0,80	
2	0,96	
3	0,82	
4	0,80	
5		0,69
6		0,58
7		0,71
8		0,71
Valeurs moyennes d'ADN exprimées en µg ADN/mg protéines	0,84	0,67

TABLEAU 1. *Quantité d'ADN mitochondrial. Elle est exprimée en µg/mg de protéines et mesurée après dosage colorimétrique de l'ADN extrait à l'ATC de mitochondries isolées.*

3-4. VISUALISATION DES MOLECULES D'ADN.

Partant d'ADN purifié et de mitochondries lysées par choc osmotique, Suyama et Miura (1968) ont montré que la molécule de l'ADN mitochondrial de la souche ST est linéaire et mesure 17,6 µ. Il nous a semblé intéressant d'une part, de rechercher si une modification des conditions de lyse par choc osmotique avait un effet sur la dispersion des molécules d'ADN autour de la mitochondrie, d'autre part, d'obtenir en utilisant un procédé de lyse autre que le choc osmotique, des molécules isolées d'ADN sans extraction par voie chimique.

3-4-1. Lyse des mitochondries par choc osmotique

Par cette technique, l'ADN se disperse de deux façons (fig. 13 à 19): les molécules restent enchevêtrées (fig. 13, 14, 15 et 16) ou bien certaines se dégagent de l'ensemble et apparaissent isolées (fig.17 et 19).

Il est difficile de déceler les bouts libres des molécules, mais il est possible de mesurer la longueur totale de l'ADN par mitochondrie (fig. 13 et 15). On trouve 100 à 110 µ d'ADN par mitochondrie. Il s'agit d'une longueur mesurée par défaut, car l'enchevêtrement des molécules dans ces images est compliqué , et les membranes mitochondriales masquent souvent une partie de l'ADN. La phase de la culture, exponentielle ou stationnaire, ne change pas la quantité d'ADN par mitochondrie. Cette longueur de 100 à 110 µ environ correspond à un poids moléculaire de 2.10^8 daltons.

Dans les exemples des figures 13 et 15, l'ADN est resté groupé autour des membranes mitochondriales, alors que les exemples des figures 14 et 16 montrent de l'ADN, des crêtes et des membranes mitochondriales, extrêmement dispersés. Sur certaines de ces préparations (fig.6), l'enchevêtrement des molécules est moindre, et on peut les mesurer avec plus de facilité, bien que les résidus de crêtes ou de membranes masquent fréquemment certaines parties de la molécule dont l'origine est souvent difficile à déceler.

La technique de lyse par choc osmotique donne néanmoins la possibilité d'observer des molécules linéaires bien individualisées. Pour cela, les mitochondries sont suspendues dans une solution d'acétate d'ammonium 4M et laissées en attente dans la glace 45 minutes à 1 heure. Les grilles sont récoltées 15 minutes après l'étalement. Les molécules présentent deux bouts libres (fig. 17 et 19); celle de la figure 17 mesure 17,7 µ et certaines de ses portions sont vrillées comme le sont les molécules circulaires intactes. On trouve également des portions vrillées (fig. 18 et 19) sur des molécules qui sont restées enchevêtrées ou au voisinage des membranes.

Sur les figures 13 et 15, certaines molécules semblent liées aux membranes mitochondriales. La préparation de la figure 15 a été ombrée bidirectionnellement, les deux directions formant un angle de 90°; mais l'ombrage plus important dans une des directions que dans l'autre, paraît de ce fait unidirectionnel. Le fragment de mitochondrie n'est pas en totalité dans le plan du film de formar, et placé perpendiculairement à la direction de l'ombrage, il forme une zone d'ombre sur la préparation. Deux molécules d'ADN fixées aux crêtes du fragment mitochondrial sont visibles sur un court trajet, disparaissent et réapparaissent à leur sortie de la zone d'ombre. L'ombrage rotatif n'aurait pas permis de voir ces deux molécules accrochées à des résidus de membranes. Ce qu'il montre, ce sont des molécules d'ADN dont certaines sont recouvertes de fragments de membranes mitochondriales; mais on ne sait pas s'il y a continuité entre la molécule et la membrane ou bien simplement dépot aléatoire de débris membranaires sur l'ADN au cours de la préparation. L'image vue sur la figure 15 est un cas favorable d'observation de liaison entre l'ADN et les membranes mitochondriales.

3-4-2. Lyse des mitochondries par le désoxycholate de sodium.

La technique qui consiste à lyser les mitochondries avant leur étalement nous a permis d'observer de nombreuses molécules linéaires, débarassées le plus souvent des résidus de crêtes (figures 20 à 23). Néanmoins, on observe encore des molécules enchevêtrées à l'une de leurs extrémités et libres à l'autre, sur une certaine longueur (figure 24). Nous n'avons jamais observé au cours de ces expériences de molécules à portions vrillées comme celles que nous avons trouvées après une lyse des mitochondries par choc osmotique, après une longue incubation dans l'acétate d'ammonium. Nous avons mesuré 235 molécules linéaires et en avons dressé l'histogramme (Fig. I) . Leur longueur varie de 4 µ à 30 µ, 78% ont une longueur située entre 12 µ et 20 µ avec une classe prédominante de 15 µ .

3-5. DISCUSSION

3-5-1. Mitochondries

Les mitochondries des trois souches utilisées sont très riches en crêtes tubulaires. Ces crêtes sont serrées et laissent peu d'espace à la matrice. La souche ST est caractérisée par l'existence dans la matrice d'inclusions de nature protéique dont le volume augmente pendant la phase stationnaire. Nous n'avons aucune hypothèse sur le rôle de ces inclusions.

Les mitochondries isolées que nous avons utilisées pour la préparation de l'ADN présentent les 3 types morphologiques décrits sur la souche HSM par Schwab-Stey et Coll. (1971) qui leur appliquent la terminologie de Hackenbrock (1966). Ce dernier pense que les changements ultrastructuraux constatés dans les mitochondries expriment une différence dans l'état métabolique de l'organite. Si, chez *Tetrahymena* , différents états métaboliques existent

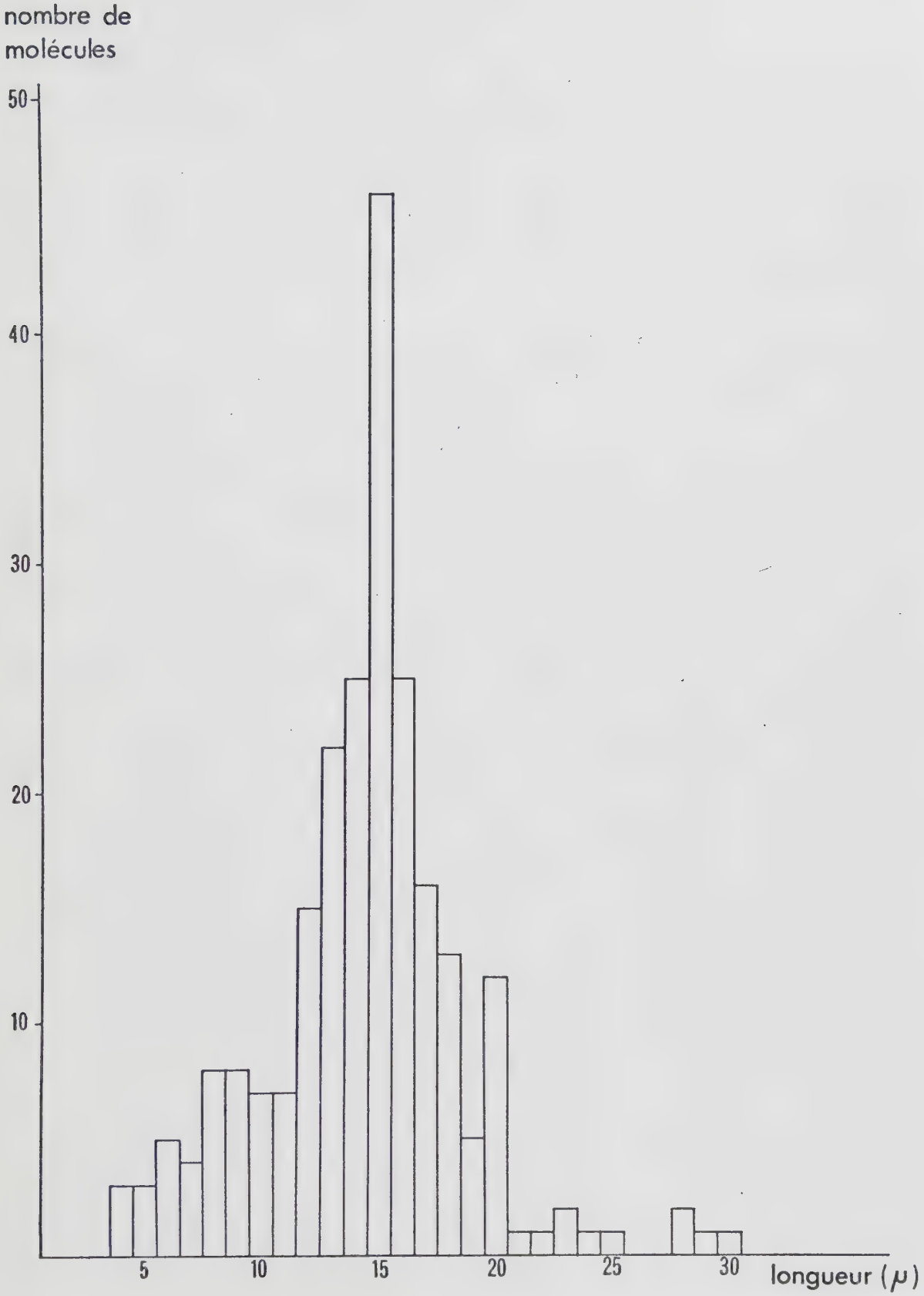


Figure I - *Histogramme représentant la distribution des longueurs des molécules linéaires d'ADN mitochondrial étalées à partir de mitochondries lysées par le désoxycholate de sodium.*

ils ne sont absolument pas décelables dans la structure d'une mitochondrie observée avec les procédés habituels de fixation des cellules. Nous pensons que les différences observées sont dues à des altérations mécaniques de la membrane externe au cours du broyage des cellules et de l'isolement des mitochondries. Dans les mitochondries contractées, une modification dans la perméabilité de la membrane provoquerait la dilatation de l'espace intermembranaire.

3-5-2. Quantité d'ADN mitochondrial

Les quantités d'ADN par mg de protéines mitochondriales sont pour la souche ST de 0,84 µg/mg de protéines pour la phase exponentielle, de 0,67 µg/mg de protéines pour la phase stationnaire. La quantité d'ADN par mitochondrie ne varie pas avec la phase de la culture. En effet, ces mesures sont faites sur la souche ST qui, en phase stationnaire, possède dans ses mitochondries des inclusions protéiques plus volumineuses qu'en phase exponentielle et il est possible que la quantité de protéines abaisse le rapport ADN/protéines.

Les chiffres que nous avons obtenus sont en accord avec ceux dont il est fait état chez d'autres organismes (tableau 2); les résultats qui proviennent de cultures en phase exponentielle sont plus proches des Végétaux supérieurs et des Champignons que du foie de rat. Suyama (1967) donne une valeur légèrement supérieure aux nôtres (1,2 µg d'ADN /mg de protéines) en utilisant une technique différente de la nôtre: la quantité d'ADN est mesurée après son extraction au phénol.

	µg d'ADN par mg de protéines	Réf.
Foie de rat	0,65	Nass et Coll. (1965)
"	0,54	Schneider et Kuff (1965)
"	0,45	Schatz et Coll. (1964b)
coeur d'agneau	0,3 à 0,6	Kalf et Grece (1966)
Plantes supérieures	0,8	Suyama et Bonner (1966)
Neurospora	0,7	Luck et Reich (1964)
Saccharomyces	1,1 à 4,5	Schatz et Coll.(1964a)
Tetrahymena	1,2	Suyama (1967)

TABLEAU 2. *Quantité d'ADN mitochondrial par mg de protéines dans quelques Eucaryotes*

3-5-3. ADN isolé

Les caractéristiques biochimiques de l'ADN mitochondrial de la souche ST d'après Suyama (1966) et Flavell et Jones (1970) sont les suivantes: le coefficient de sédimentation est de 40 S environ, la densité de flottaison 1,686 g/cm^3, le pourcentage de G + C, 25%. Suyama (1968) pense que la molécule de 17,6 µ trouvée dans des fractions 41 S représente l'état natif de l'ADN dans la mitochondrie de *Tetrahymena*.Nos résultats s'accordent pleinement avec ceux de Flavell et Jones (1970) dont les études des cinétiques de réassociation de l'ADN dénaturé suggèrent une complexité génétique de 30.10^6 daltons, c'est à dire 15 µ.

Autour des mitochondries éclatées par choc osmotique il y a 100 à 110 µ d'ADN ce qui représente un poids moléculaire de 2.10^8 daltons. Même si une partie de l'ADN mitochondrial n'a pas été expulsée ou si elle est masquée par les débris de membranes, la quantité d'ADN dans la souche ST est notablement supérieure à celle observée pour les Vertébrés.

Chez ces derniers, on a montré qu'il y a 2 (Pikó et Coll. 1967) à 14 molécules (Nass, 1966) par mitochondrie, ce qui signifie 10 à 70 µ d'ADN représentant un poids moléculaire de 2.10^7 à 14.10^7 daltons. Chez *Tetrahymena*, il y a 7 à 8 molécules de 15 µ; elles possèderaient au moins en commun certaines séquences de bases extrêmement identiques puisque la renaturation d'un ADN préalablement renaturé, puis dénaturé donne un produit qui a la même température de fusion que l'ADN natif (Flavell et Jones, 1970). Les quelques molécules de 28 à 30 µ que nous avons observées sont peut-être des dimères composés de 2 unités génétiques identiques de 15 µ.

La mise en évidence de la circularité des molécules d'ADN semble se généraliser. Dans certains cas, ces molécules sont plus longues que celles des mitochondries de Vertébrés. *Saccharomyces cerevisiae* possède des molécules de 25 µ (Hollenberg et Coll., 1969). Très récemment, Clayton et Brambl (1972) et Agsterribe et Coll. (1972) ont mis en évidence des molécules circulaires de 20 µ environ chez *Neurospora crassa*. Cet organisme était jusqu'à présent considéré comme possédant une molécule linéaire (Luck et Reich, 1964) mesurant 25 à 26 µ, longueur déterminée d'après le poids moléculaire. Ce dernier est estimé d'après la cinétique de renaturation (Wood et Luck, 1969) et par un examen au microscope électronique (Schafer et Coll., 1971).

Chez *Tetrahymena*, par lyse osmotique suivie d'une incubation pendant environ une heure dans une solution d'acétate d'ammonium concentré, nous avons obtenu des molécules isolées les unes des autres. Il semble, dans ces conditions, que les molécules se dégagent plus facilement de l'ensemble des membranes, et donnent un réseau à mailles plus lâches. Pour des mitochondries de cellules normales, c'est le temps pendant lequel elles sont suspendues dans l'acétate d'ammonium, et non la concentration en sel qui

influe sur la dispersion des molécules. Elles sont linéaires, mais certaines présentent des portions vrillées comme celles que l'on observe sur des molécules circulaires intactes (Nass, 1966, Sinclair et Stevens, 1966, Van Bruggen et Coll., 1966). La présence de ces portions vrillées est une présomption que l'ADN mitochondrial existe *in situ*, sous la forme de molécules circulaires fermées. L'idée de l'existence possible d'un ADN mitochondrial circulaire chez *Tetrahymena* est exprimée par Arnberg et Coll. (1972); c'est l'observation et la distribution des " boucles déplacées" (D-loop) sur plusieurs molécules linéaires qui leur en fournit l'argument. Les boucles déplacées sont décrites par Kasamatsu et Coll.(1971) sur de l'ADN mitochondrial de cellules en cultures, par Arnberg et Coll. (1971, 1972) sur de l'ADN circulaire de poulet et sur de l'ADN mitochondrial linéaire de *Tetrahymena* . Arnberg et Coll superposent les cercles obtenus en refermant artificiellement les molécules linéaires et cherchent, par rotation des molécules à faire coincider le plus grand nombre possible de boucles. Ces auteurs voient dans leurs résultats une indication que les boucles occupent sur la molécule circulaire un emplacement unique. Les molécules circulaires se transformeraient en molécules linéaires par une rupture en un point non préférentiel de la double chaîne. Nous n'avons pas observé de telles boucles, mais il est possible que notre technique de visualisation des molécules ne permette pas de conserver le brin simple chaîne de la boucle déplacée.

Certaines de nos images suggèrent une liaison de la molécule aux membranes. Chez les Vertébrés, Nass (1966) a signalé des faits analogues, en observant de l'ADN circulaire de foie de rat après une lyse osmotique des mitochondries. Il est impossible de savoir si l'image que nous avons sur la figure 15, c'est à dire le lien de l'ADN à des membranes mitochondriales existe *in vivo* ou s'il s'agit d'un artifice

de préparation dû à une adsorption. Si la molécule est attachée à la membrane, les molécules peuvent devenir linéaires de deux façons: le rupture se produit au point d'attachement, ou au contraire en un point de la molécule libre dans la matrice. Cette hypothèse est compatible avec l'observation de molécules circulaires à condition de supposer que le lien entre molécule et membrane est très labile. Lorsque nous voyons des molécules attachées aux membranes, nous nous trouvons probablement en présence de réarrangements secondaires qui interviennent au cours de la préparation.

La grande longueur d'une molécule circulaire ne paraît pas être un obstacle à son obtention intacte puisque Hollenberg et Coll. (1969) chez *Saccharomyces cerevisiae*, Clayton et Brambl (1972) et Agsterribe et coll. (1972) chez *Neurospora crassa* en ont obtenu de 25 µ et 20 µ. Toutefois, il faut noter que les mitochondries de ces organismes sont beaucoup moins riches en crêtes que celles de *Tetrahymena* où les crêtes tubulaires sont nombreuses et enchevêtrées. Cette situation est susceptible d'augmenter les chances de rupture de la molécule lors de la lyse. En conclusion, il ne semble pas impossible que l'ADN mitochondrial de *Tetrahymena pyriformis* existe sous la forme de molécules circulaires, de 15 à 17 µ mais la conformation particulière des mitochondries de ce Cilié ne permettrait pas de conserver la molécule intacte.

Bien que la plupart des cultures utilisées soient en phase exponentielle de croissance, avec une synthèse active d'ADN mitochondrial (voir chapitre 4) nous n'avons pas vu l'ADN en réplication. Alors que celle d'un ADN mitochondrial circulaire est visualisée sans ambiguité possible (Kirschner et Coll., 1968), il n'en est pas de même pour un ADN à molécules linéaires: cependant, Arnberg et Coll. (1972) pensent que les multiples boucles déplacées

qu'ils ont observées sur les molécules d'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena* peuvent s'expliquer par une réplication à multiples sites d'initiation.

Les quantités d'ADN rapportées aux protéines et la longueur de la molécule sont supérieures à celles des Vertébrés, et proches de celles des Végétaux supérieurs et des Champignons. Si le pouvoir informatif de l'ADN mitochondrial est limité à une seule molécule et en supposant que toutes les molécules d'ADN mitochondrial sont génétiquement identiques (Kroon, 1971), il y aurait chez *Tetrahymena* trois fois plus d'information que dans une mitochondrie de cellule hépatique, à condition que toutes les séquences soient utilisables.

Le pouvoir informatif possible de l'ADN mitochondrial est plus grand chez les Végétaux supérieurs, les Champignons et *Tetrahymena pyriformis* que chez les Vertébrés; il a évolué dans le sens suppressif au fur à mesure que l'on s'élève dans l'échelle de l'évolution (Rabinowitz et Swift, 1970, Borst, 1971).

4. SYNTHESE ET STABILITE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

Dès que la présence d'ADN dans les mitochondries a été établie, la question s'est posée de savoir comment cet ADN se réplique et surtout quels sont les rapports entre la synthèse de l'ADN mitochondrial et celle de l'ADN nucléaire. Pour certains, il y aurait cession d'ADN par le noyau aux mitochondries (Bell et Muhlethaler, 1964), pour d'autres au contraire (Chévremont et Coll., 1961) il y aurait transport d'ADN des mitochondries vers le noyau.

Actuellement, il est bien établi que dans la plupart des organismes la synthèse de l'ADN mitochondrial se fait *in situ* dans la mitochondrie, tout au long du cycle cellulaire, pendant les phases G_1 et G_2 nucléaires et sans augmentation d'intensité lors de la phase S nucléaire. Ces résultats excluent la possibilité pour l'ADN mitochondrial de provenir du noyau. Les travaux sont nombreux à ce propos (revue par Rabinowitz et Swift, 1970). Nous l'avons montré sur *Tetrahymena pyriformis* par autoradiographie quantitative à haute résolution. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Charret et André, 1968). Nous nous bornerons à rappeler les résultats et les compléterons avec ceux obtenus sur d'autres souches.

D'autre part, nous étudierons la stabilité de l'ADN mitochondrial d'une culture en masse dans le but de comparer nos résultats à ceux qu'ont obtenu Stone et Miller (1965) et Parsons et Rustad (1968) qui ont démontré uns stabilité de l'ADN mitochondrial sur des cellules suivies individuellement pendant 4 générations.

4-1. RADIOACTIVITE DES MITOCHONDRIES PRISES INDIVIDUELLEMENT

4-1-1. Incorporation de thymidine ^3H (publication 1 en annexe).

L'addition de thymidine ^3H à des cultures de souches 1, GL ou ST et leur autoradiographie au microscope électronique montrent l'existence de grains d'argent situés en quasi totalité sur les noyaux et les mitochondries (fig. 25, 33 et 36). Ces grains disparaissent après un traitement à la DNase (fig. 26 et 27).

4-1-2. Intensité du marquage en fonction du temps.

Nous avons montré sur la souche 1 que le pourcentage de mitochondries marquées augmente en fonction du temps de marquage pour l'intervalle de temps considéré. Les souches ST et GL se comportent de façon identique. Les résultats sont représentés sur la figure II et dans la publication 1 en annexe. Il y a davantage de mitochondries marquées après la même durée de marquage dans les souches amicronucléées ST et GL que dans la souche micronucléée 1. C'est dans la souche ST, qui a un temps de génération plus court que la souche GL, que le pourcentage de mitochondries radioactives est le plus élevé, pour la même durée de marquage

4-1-3. Comparaison de la répartition des grains d'argent sur les mitochondries à une distribution de Poisson.

Le nombre de grains d'argent par mitochondrie est compté:

1) au cours d'un marquage pour des durées étagées de 2 à 12 heures (tableau 3).

2) à différents temps, 8 heures (t_1, fig.30), 15 heures (t_2, fig. 29 et 31), 22 heures (t_3, fig. 32) et 29 heures (t_4), après la remise en suspension dans un milieu sans précurseur

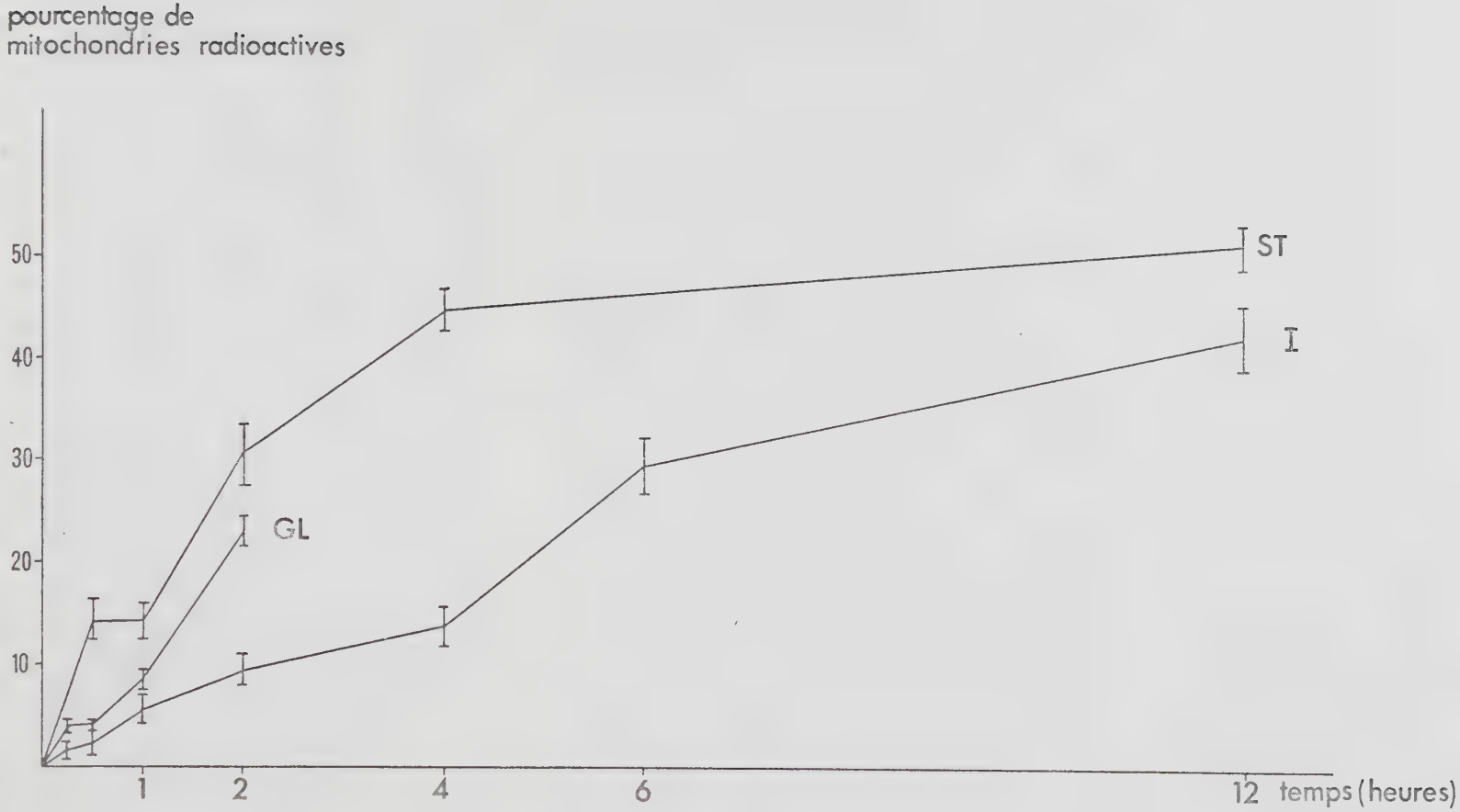


Figure II - *Représentation graphique de l'intensité du marquage des mitochondries en fonction du temps. Thymidine ^{3}H, souche I, 200 µCi/ml, activité spécifique 9,7 Ci/mM ; souche GL, 200 µCi/ml, activité spécifique 14,7 Ci/mM ; souche ST, 100 µCi/ml, activité spécifique 25 Ci/mM.*

Nombre de grains / Temps	0	1	2	3	4	5	χ^2 au seuil de 5 %
2 h.	1285 1276,41	124 141,41	17 8,13				12,90>5,991 n = 2
4 h.	985 968,17	129 161,53	28 14,30	2			18,27>5,991 n = 2
6 h.	574 534	165 226,35	54 47,98	19 7,67	4		35,79>7,81 n = 3
12 h.	497 466,55	240 285,35	90 87,29	28 20,81	3	2	11,43>7,81 n = 3

TABLEAU 3. *Distribution des nombres de grains d'argent observés par mitochondrie, comparée à la distribution de Poisson correspondante.*

Temps	Nombre de grains	0	1	2	3	4	5	6	χ^2
t_o	Nombre observé	138	174	145	95	35	20	13	33,09>9,48
	Nombre théorique	110,74	190,75	164,28	94,32	40,61	13,99	4,01	n = 4
t_1	Nombre observé	312	302	146	80	26	15	4	34,27>7,81
	Nombre théorique	274,17	321,24	188,17	73,48	21,52	5,04		n = 3
t_2	Nombre observé	495	295	80	36	13	2	1	35,85>5,99
	Nombre théorique	465,10	318,26	108,88	24,83	4,24			n = 2
t_3	Nombre observé	443	174	55	13	5	0		24,72>5,99
	Nombre théorique	419,79	208,67	51,86	8,59	1,06			n = 2
t_4	Nombre observé	736	166	51	10	1			31,35>3,84
	Nombre théorique	704,78	220,75	34,57	3,61				n = 1

TABLEAU 4. *Distribution des nombres de grains d'argent observés par mitochondrie, comparée à la distribution de Poisson correspondante.*

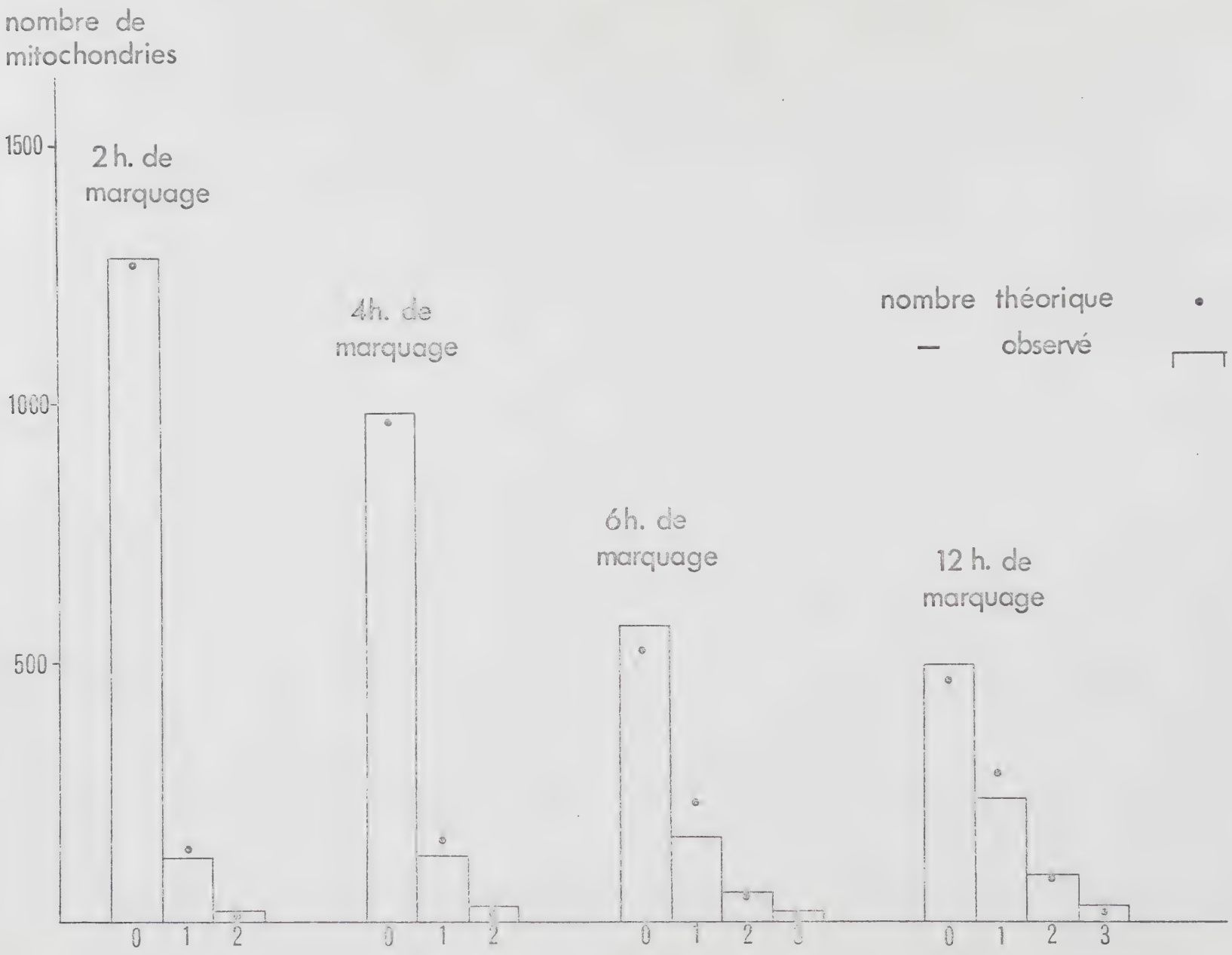


Figure III - *Histogrammes représentant la distribution des nombres de grains d'argent observés par mitochondrie et la distribution théorique de Poisson. Durée du marquage, étagée de 2 heures à 12 heures.*

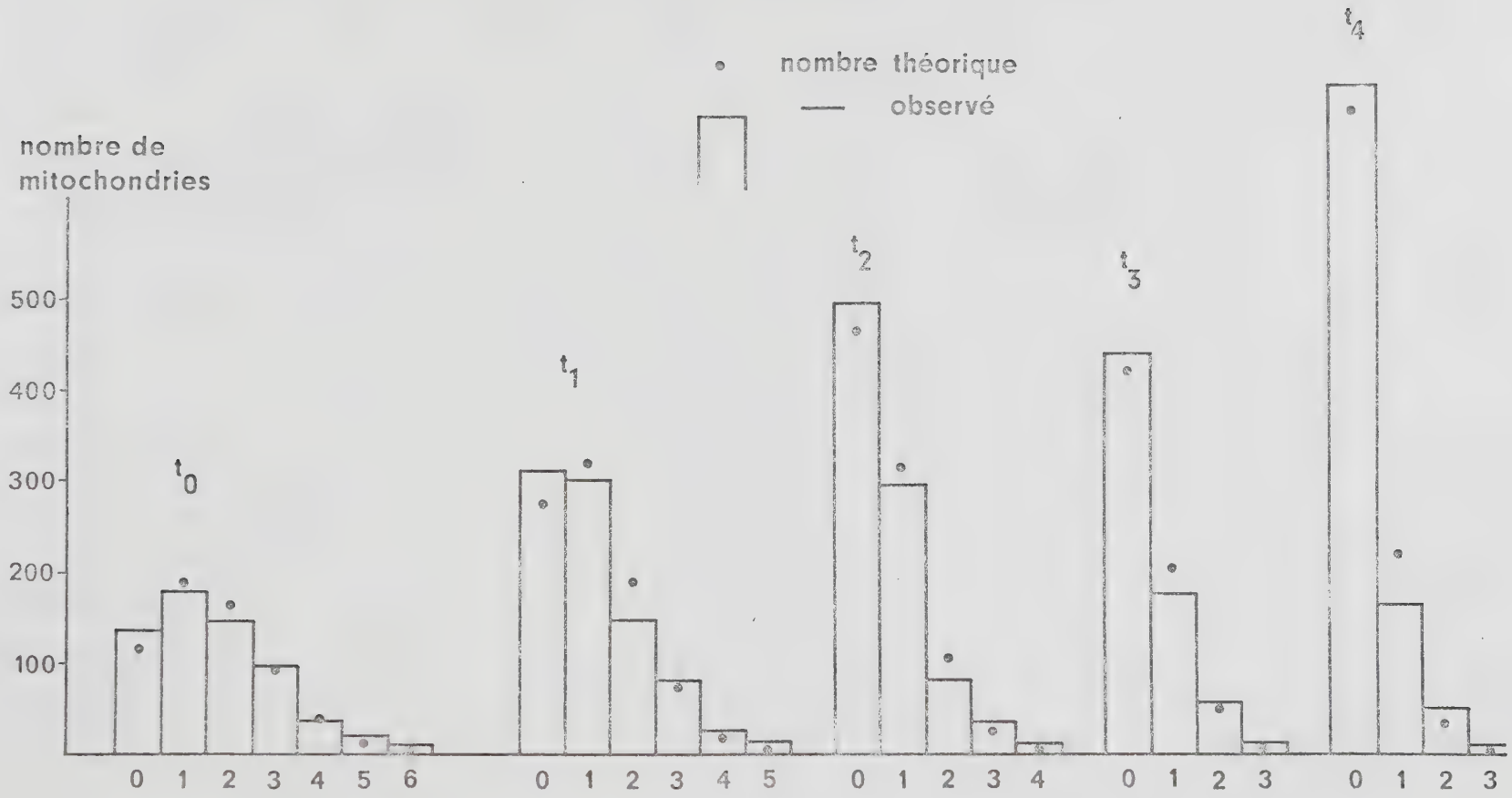


Figure IV - *Histogrammes représentant la distribution des nombres de grains d'argent observés par mitochondrie et la distribution théorique de Poisson. Marquage initial de la culture, 24 heures (t_0), puis culture en milieu froid pendant 29 heures (t_1 à t_4).*

radioactif, d'une culture préalablement marquée pendant 24 heures (fig. 28, tableau 4).

Après une croissance en milieu froid il y a moins de grains d'argent en dehors des mitochondries (fig. 29) que dans une cellule marquée 24 heures (fig.28); les mitochondries restent encore radioactives, le nombre de grains d'argent par organite diminuant en fonction du temps (fig. 30 et 32).

Dans les tableaux 3 et 4,pour chaque classe de nombre de grains d'argent sont notés les nombres de mitochondries observés et les nombres théoriques calculés dans le cas d'une distribution de Poisson. Ces valeurs sont reportées sur des histogrammes (fig. III et IV). Les valeurs de χ^2 sont calculées pour chaque temps de marquage.

4-2. INTENSITE DU MARQUAGE MITOCHONDRIAL EN FONCTION DU MARQUAGE DES NOYAUX.

Nous avons montré que dans la souche 1 (Charret et André, 1968, publication 1 en annexe), il n'y a pas de différence dans le marquage mitochondrial, que les noyaux soient ou non en phase S (fig. 33 et 34, tableaux II et III de la publication 1 en annexe).

Nous avons effectué les mêmes expériences avec la souche GL, souche amicronucléée (fig. 35 et 36). Les résultats sont absolument identiques et sont rapportés sur le tableau 5 (comparer le tableau 5 avec les tableaux II et III de la publication en annexe).

4-3. STABILITE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

Les expériences qui suivent sont effectuées sur des cultures en masse, afin d'étudier pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire, la dilution de la radioactivité de l'ADN mitochondrial de cellules initialement marquées et remises en milieu froid.

Temps	15 min.		30 min.		1 h.		2 h.	
Macronoyau	non marqué	marqué	non marqué	marqué	non marqué	marqué	non marqué	marqué
Nombre de mitochondries radioactives	32	20	27	24	61	36	112	149
Nombre total de mitochondries	792	462	856	424	747	388	473	632
Pourcentage et écart type	$4,0 \pm 1,4$	$4,3 \pm 1,8$	$3,1 \pm 1,1$	$5,6 \pm 2,2$	$8,1 \pm 2,0$	$9,2 \pm 2,9$	$23,6 \pm 1,9$	$23,5 \pm 3,3$
Comparaison des pourcentages	Non sign.*		Non sign.*		Non sign.*		Non sign.*	

* Non sign. : différence non significative.

TABLEAU 5. *Marquage mitochondrial en fonction du marquage macronucléaire dans la souche GL. On a comparé, pour chaque temps de marquage, les pourcentages des mitochondries radioactives dans le cas du noyau non marqué avec celui du noyau marqué. Les tests de comparaison des pourcentages ont été effectués par la méthode classique du χ^2 de Pearson, le seuil de signification étant le seuil habituel de 5 %.*

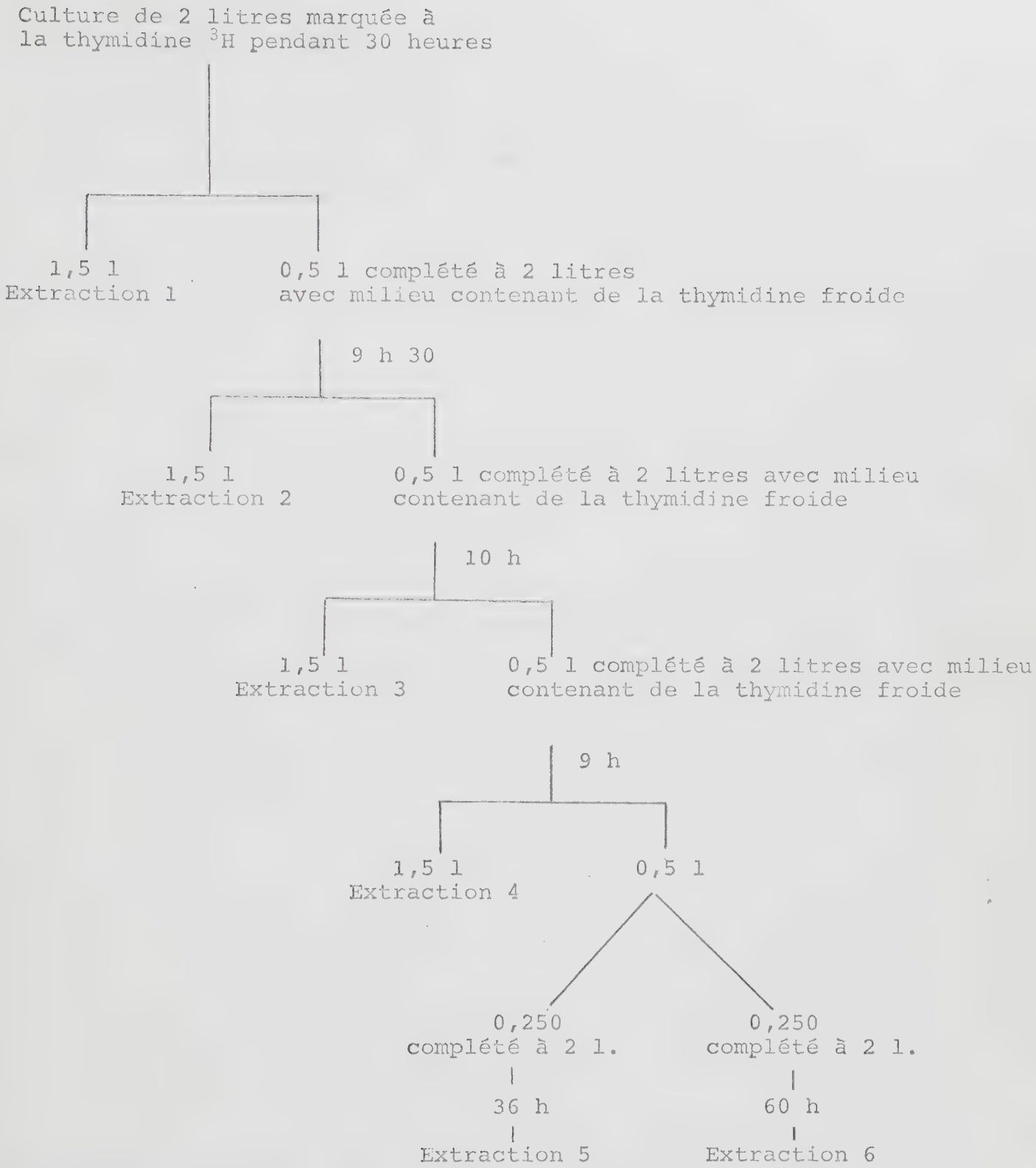


Figure V - *Phase exponentielle prolongée. Protocole de l'expérience qui permet de maintenir la culture en phase exponentielle et de diluer la radioactivité initiale. Marquage initial 2 µCi/ml d'une thymidine ^{3}H d'activité spécifique 25 Ci/mM.*

4-3-1. Maintien de la culture en phase exponentielle.

Le temps mis par la culture pour atteindre la phase stationnaire dépend du nombre de cellules de l'inoculum et du volume du milieu : pour un même volume, l'arrêt de la multiplication est d'autant plus vite atteint que le nombre de cellules repiquées est élevé. Pour maintenir des cultures en phase exponentielle pendant une longue durée et avoir suffisamment de cellules pour isoler les mitochondries, nous avons utilisé le protocole schématisé par les figures V et VI.

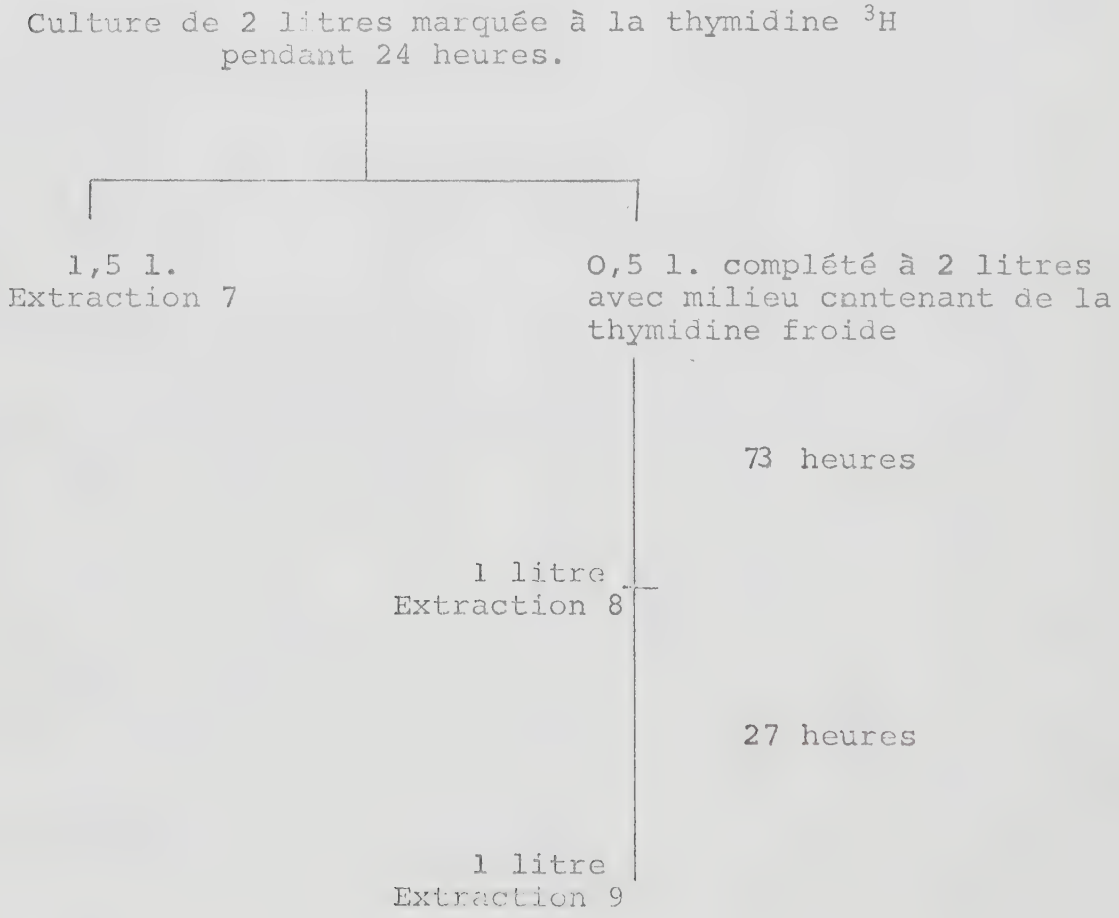


FIGURE VI. *Phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire de 27 heures. Marquage initial, thymidine ^3H , activité spécifique 25 Ci/mM, dose 2 µCi/ml.*

Dans l'expérience de la figure V nous avons maintenu les cultures en phase exponentielle et dilué la radioactivité initiale. Pour cela, elles ont été repiquées dans une milieu dépourvu de thymidine ^{3}H et enrichi en thymidine froide à la dose de 5 µg/ml (dose 1000 fois supérieure à la dose initiale de thymidine chaude). Dans l'expérience de la figure VI, le repiquage et la dilution n'ont été effectués qu'une seule fois.

4-3-2. Résultats.

Les courbes de croissance des cultures sont représentées sur les figures VII et VIII. Les prélèvements en vue de l'isolement des mitochondries et de l'extraction de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire sont effectués aux temps indiqués par les nombres 1 à 9.

Les prélèvements 1 et 7 concernent des cultures marquées respectivement 30 et 24 heures, les autres des cultures en milieu froid. Le temps qui s'écoule entre chaque prélèvement peut être chiffré en nombre de générations cellulaires; connaissant le nombre N_0 au temps T_0, et le nombre N_1 au temps T_1, le nombre de générations n est calculé à partir de la relation

$$\frac{N_1}{N_0} = 2^n$$

ces nombres de générations sont donnés dans le tableau 6.

Sur les tableaux 7 et 8 figurent l'activité spécifique de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire exprimée en cpm/µg d'ADN, le nombre de générations cellulaires effectuées par les cellules entre chaque prélèvement, et le nombre de générations effectuées à partir de la remise en culture en milieu froid. Les variations de radioactivité des ADN sont représentées graphiquement en fonction du temps (fig. IX), et en fonction du nombre de générations (fig. X).

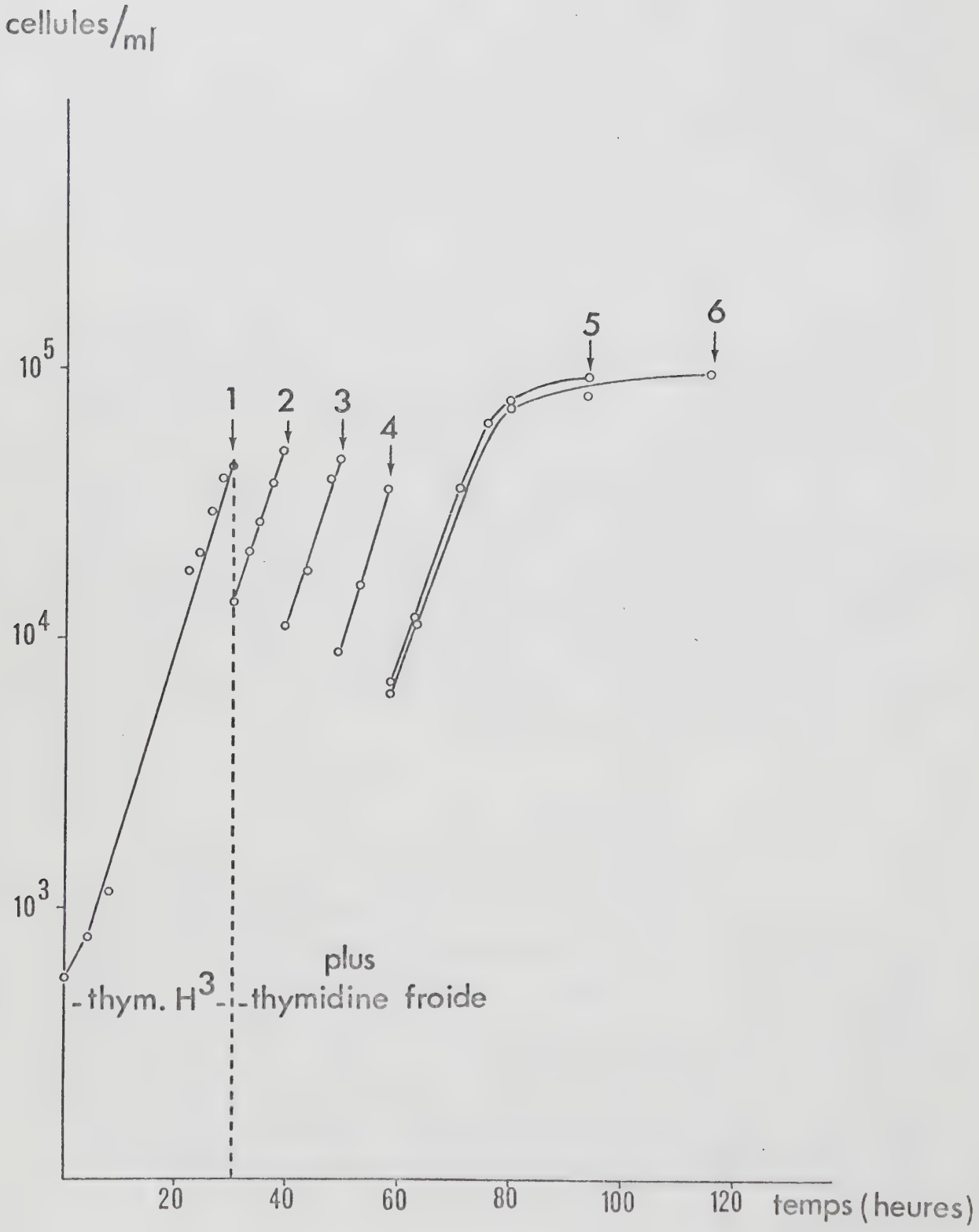


Figure VII - *Courbes de croissance de la culture utilisée dans l'expérience de la figure V. Les prélèvements sont figurés par les nombres 1 à 6.*

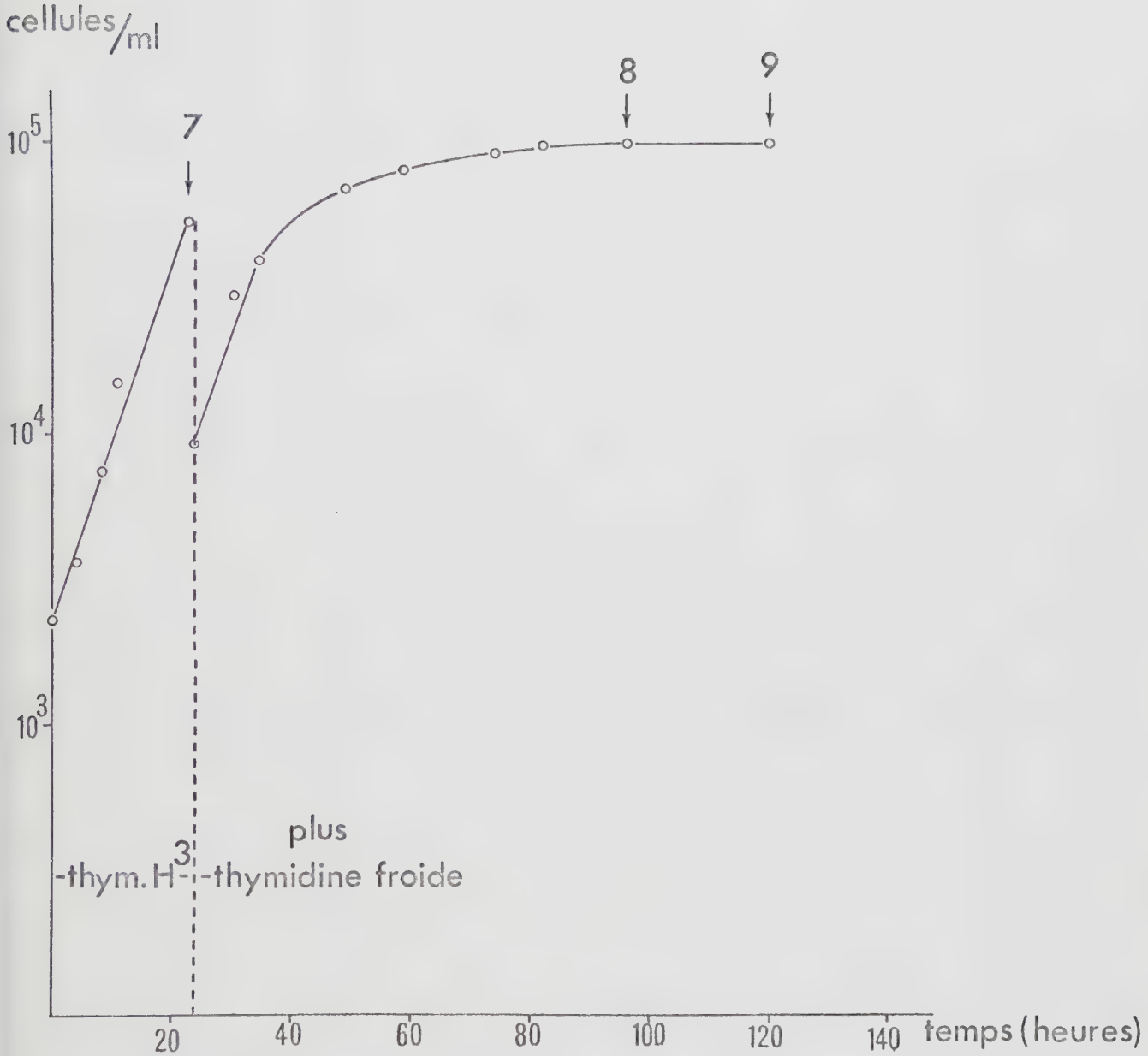


Figure VIII - *Courbe de croissance de la culture utilisée dans l'expérience de la figure VI. Les prélèvements sont figurés par les nombres 7 à 9.*

Expériences N° Extraction	Nombre de Cellules/ml N_0	N_1	Nombre de Générations n	Conditions d'Expérience
1		44 445		+ Thymidine ^3H
2	13 455	48 300	1,85	+ 1000 x Thymidine froide
3	11 250	45 075	2	"
4	8 835	34 665	1,97	"
5	6 765	90 000	3,7	"
6	6 285	93 600	3,8	"
7		54 810		+ Thymidine ^3H
8	9 360	99 900	3,4	+ 1000 x Thymidine froide
9	99 900	100 000	0	

TABLEAU 6. *Nombres de cellules et de générations au cours des expériences des figures V et VI.*

Numéro des Extractions	1	2	3	4	5	6
Temps en heures	0	9.30	19.30	28	64	88
Nombre de générations effectuées par la culture entre chaque prélèvement	1,85	2	1,97	3,7	0,05	
Nombre total de générations	1,85	3,85	5,82	9,52	9,57	
cpm/µg ADN mitochondrial	12205	3339	921	217	13	11
cpm/µg ADN nucléaire	14778	8229	1149	250	15	11

TABLEAU 7. *Activité spécifique en cpm/µg d'ADN de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire au cours de l'expérience de la figure V.*

Numéro des extractions	7	8	9
Temps en heures	0	73	100
Nombre de générations éffectuées par la culture entre chaque prélèvement	3,4	0	
cpm/µg ADN mitochondrial	13563	1204	1075
cpm/µg ADN nucléaire	19781	1324	1252

TABLEAU 8. *Activité spécifique exprimée en cpm/µg d'ADN de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire au cours de l'expérience de la figure VI.*

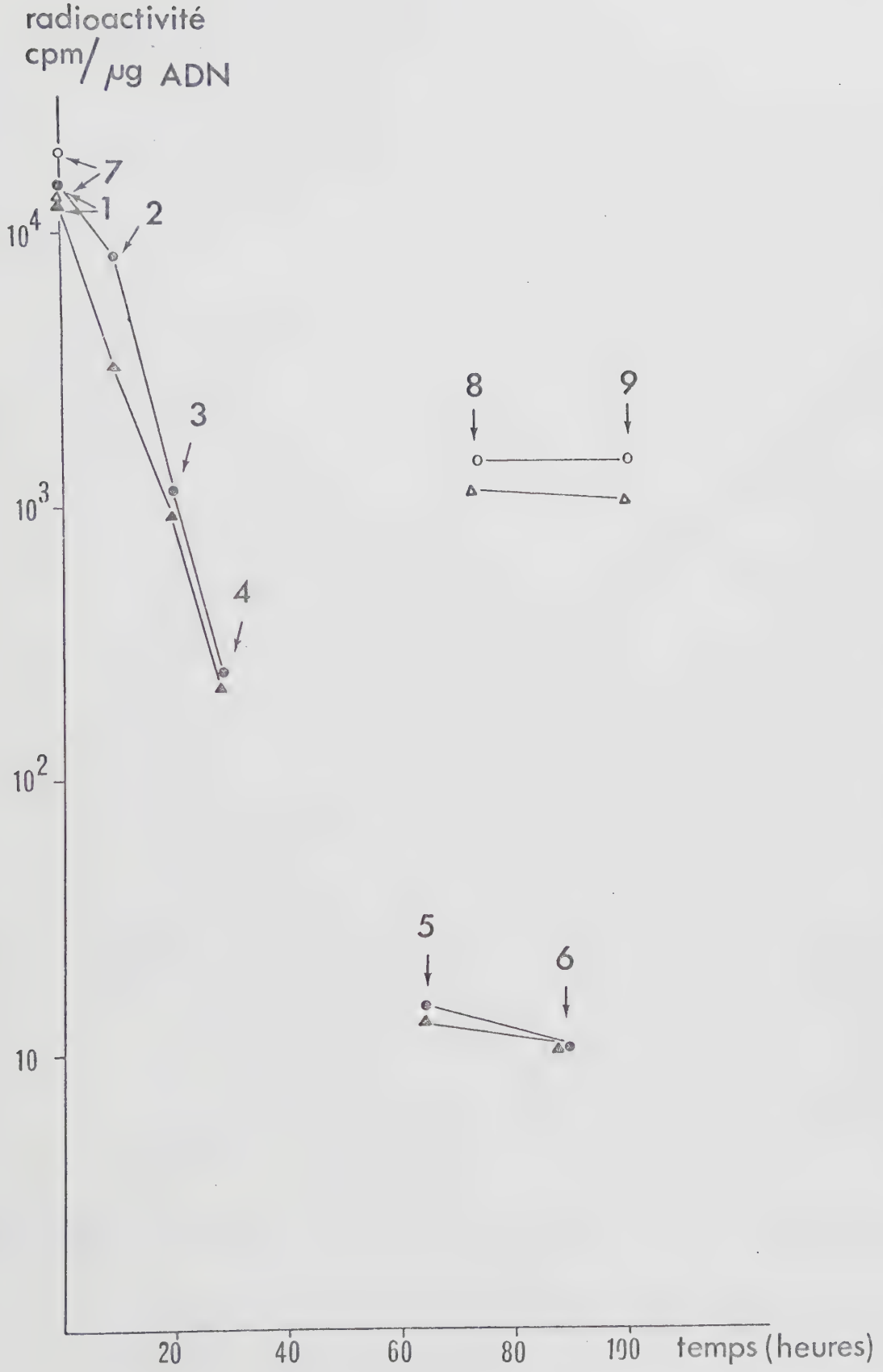


Figure IX - *Représentation graphique de la dilution de la radioactivité de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire en fonction du temps.*

o——o , •——• *ADN nucléaire*

Δ——Δ , ▲——▲ *ADN mitochondrial*

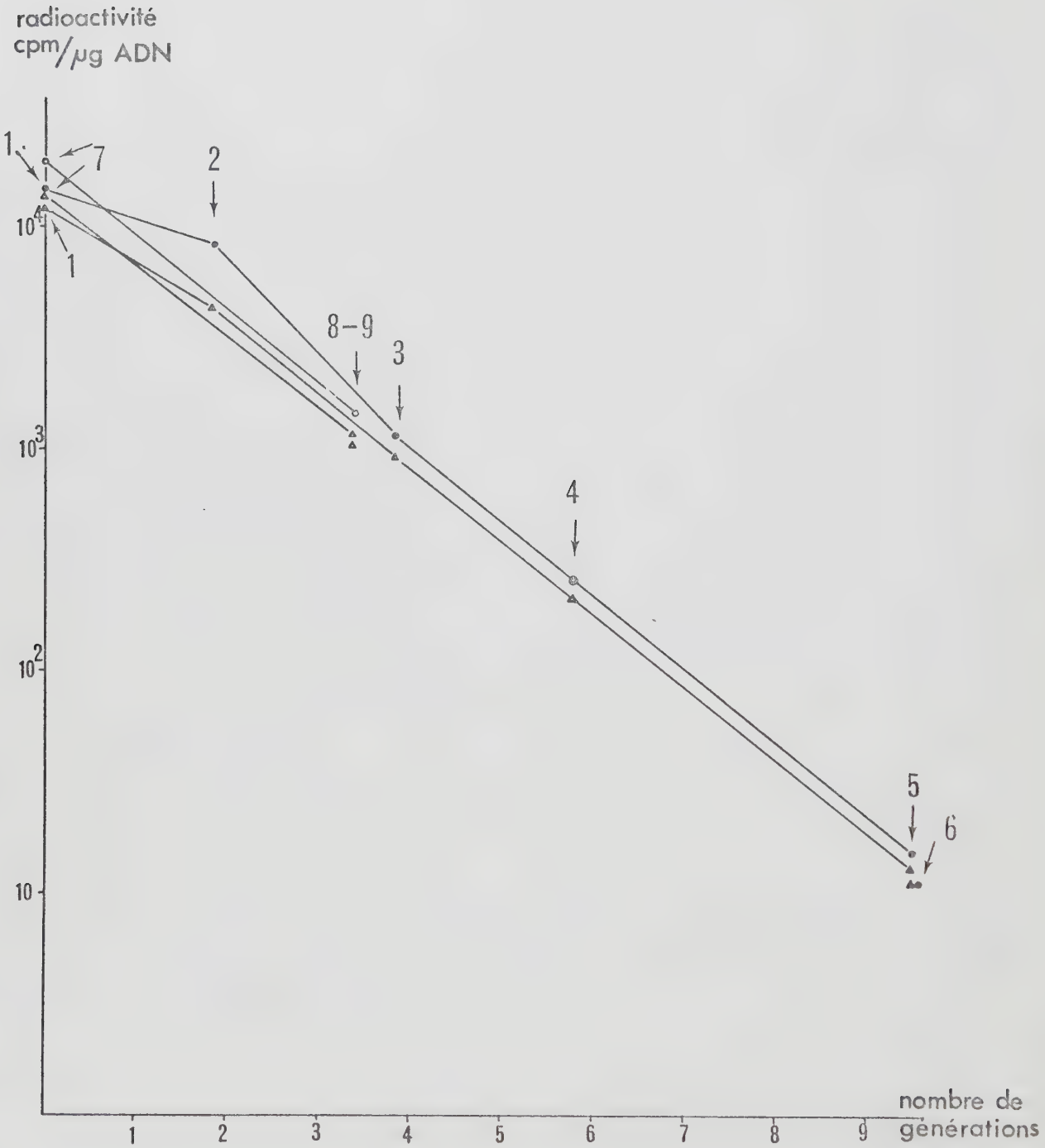


Figure X - *Représentation graphique de la dilution de la radioactivité de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire en fonction du nombre de générations effectuées par les cellules.*

o——o , •——• *ADN nucléaire*

Δ——Δ , ▲——▲ *ADN mitochondrial*

Ces courbes montrent que la radioactivité diminue d'environ moitié à chaque génération jusqu'aux prélèvements 6 et 8, c'est à dire tant que les cellules se divisent. Ces points marquent le début de la phase stationnaire, pendant laquelle sont effectués les prélèvements 7 et 9. Entre 6 et 7, cependant, on enregistre une légère augmentation du nombre de cellules(fig.VII).

Au cours de la période qui se situe entre 8 et 9, et pendant laquelle la multiplication cellulaire est nulle, il apparaît une différence plus élevée entre l'activité spécifique de l'ADN extrait des mitochondries prélevées en 8 et celle de l'ADN extrait des mitochondries prélevées en 9, qu'entre les valeurs correspondantes de l'ADN nucléaire. Afin de savoir si ces mesures sont significativement différentes, nous avons comparé la valeur moyenne obtenue pour chacune d'elles en 8 et 9. Les résultats figurent sur le tableau 9. La différence est significative au seuil de 5% entre l'activité spécifique de l'ADN mitochondrial mesurée en 8 et celle mesurée en 9 après 27 heures de phase stationnaire, alors que la différence n'est pas significative au même seuil pour l'ADN nucléaire. Ces résultats indiquent qu'il y a au cours de la phase stationnaire une perte de radioactivité de l'ADN mitochondrial, alors que celle qui est observée dans la radioactivité de l'ADN nucléaire n'est pas significative. L'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire sont stables tant que les cellules se mutiplient, c'est à dire pour notre expérience,pendant 9 générations. En phase stationnaire, il y a une perte de radioactivité plus importante dans l'ADN mitochondrial que dans l'ADN nucléaire.

4-4. DISCUSSION

4-4-1. Validité des autoradiographies:

Chez *Tetrahymena pyriformis* en phase de croissance

	Extraction 8	Extraction 9	Moyennes	Test t
ADN mitochondrial Act. Spécif. cpm/µg ADN	1223 1239 1208 1146	1123 1035 1103 1042	$m_8 = 1204$ $m_9 = 1075$	Différence sign. au seuil de 5 %
ADN nucléaire Act. Spécif. cpm/µg ADN	1360 1267 1236 1434	1121 1197 1261 1431	$m_8 = 1324$ $m_9 = 1252$	Différence non sign. au seuil de 5 %

TABLEAU 9. *Comparaison de la moyenne des valeurs de l'activité spécifique de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire en phase stationnaire (prélèvements 8 et 9).*

exponentielle, la disposition remarquable des mitochondries à la périphérie de la cellule loin des noyaux, évite les ambiguités que pourrait poser la présence de grains d'argent d'origine nucléaire. Les grains observés en d'autres localisations que les noyaux et les mitochondries représentent pour une part très faible des grains de fond sans signification biologique, pour une autre, des molécules du précurseur tritié en transit vers les lieux de synthèse de l'ADN, et enfin des molécules diverses dans lesquelles le radical méthyle tritié a pu se trouver réincorporé (Albach, 1967, Bryant, I966). Ces grains de fond disparaissent presque tous lorsque la cellule est remise en culture dans un milieu dépourvu de précurseur. Ils ne sont pas assez nombreux pour nous permettre de mettre en doute la spécificité de l'incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN. La majorité des grains vus sur les mitochondries et les noyaux disparaissent après un traitement à la DNase. Tous ces résultats font que nous sommes en complet désaccord avec le travail de Schneider et Greco (1971) qui étudient l'incorporation de désoxyribonucléotides pyrimidiques dans le foie de rat. Ces auteurs concluent à la non spécificité de la thymidine comme précurseur de l'ADN . De même, Dobson et Cooper (1971) voient un marquage élevé du glycogène de foie de rat après une injection de thymidine ^{3}H. *In vivo*, chez *Tetrahymena*, nous n'avons jamais constaté de radioactivité significative sur le fond cytoplasmque, cependant riche en glycogène.

4-4-2. Répartition de la radioactité dans la population mitochondriale.

Le test de χ^2 dont les valeurs sont élevées pour chacune des distributions, indique une différence significative entre les nombres observés et les nombres théoriques calculés dans le cas d'une distribution de Poisson. Cependant, nous devons signaler que notre dénombrement comporte quelques

erreurs difficiles à éviter, dues à la technique. Il est relativement facile de compter les grains d'argent lorqu'ils sont peu nombreux et séparés les uns des autres sur le profil mitochondrial; mais dès que la radioactivité s'élève, et que certaines mitochondries sont marquées par plus de 3 grains, les difficultés de comptage augmentent car souvent les grains sont enchevêtrés. C'est ainsi que les classes à 4 ou 5 grains renferment probablement des mitochondries à plus de 4 ou 5 grains.

De plus, dans les autoradiographies, on range dans la classe 0, des mitochondries sur lesquelles on ne compte aucun grain et qui doivent d'être classées ainsi, à deux raisons: 1) la coupe ultrafine n'intéressant qu'un volume faible de chaque mitochondrie, ce volume peut très bien ne pas être représentatif du volume total pour le caractère qui nous intéresse, étant donné que l'ADN n'est pas réparti de façon uniforme, 2) une synthèse d'ADN peut avoir lieu dans certaines mitochondries sans qu'elle soit mise en évidence. Nous comptons donc dans la classe 0 un certain nombre de mitochondries qui sont radioactives mais que nous ne pouvons pas reconnaître. Notre classe 0 observée est surestimée, ce qui est le cas dans toutes les distributions (tableaux 3 et 4). Enfin, ces surestimations entraînent nécessairement une sous estimation des effectifs des classe voisines de la classe 0 et spécialement de la classe 1.

Les histogrammes de la figure III, représentant la répartition des grains d'argent sur les mitochondries au cours d'un marquage allant de 2 heures à 12 heures, montrent que la quantité de mitochondries à nombre élevé de grains augmente en fonction du temps; c'est l'inverse dans un milieu non radioactif, où nous ne constatons pas la persistance d'une classe à fort marquage (fig. IV). La radioactivité est de plus en plus diluée dans les mitochondries. Si l'on tient compte de la surestimation de

certaines classes, les distributions que nous avons observées reflètent un phénomène aléatoire. Ces résultats sont en accord avec ceux que l'on attend si la répartition des molécules d'ADN radioactives dans les mitochondries filles, lors de la scission des mitochondries, se fait au hasard.

Nos résultats sont identiques à ceux que Parsons et Rustad (1968) ont obtenus après autoradiographie au microscope ordinaire. Toutes les molécules de l'ADN mitochondrial de *Tetrahymena pyriformis* se comportent de façon identique en puisant à chances égales dans le pool des molécules du traceur. En l'absence de thymidine ^{3}H, lors des divisions cellulaires, les mitochondries des cellules filles restent radioactives à la suite de la distribution au hasard dans les mitochondries filles des molécules marquées présentes dans les mitochondries préexistantes. S'il n'en était pas ainsi, nous aurions dans les cellules filles une population mitochondriale à fort marquage, une autre dépourvue de marquage, ce qui serait en accord avec l'hypothèse de la formation *de novo* des mitochondries. Il n'y a pas de jeunes mitochondries, ni de vieilles mitochondries.

Ce résultat confirme celui que Bergeron et Droz (1969) ont obtenu dans leur étude de la synthèse protéique mitochondriale. Il est en accord avec ceux de Luck (1963b, 1965) et permet d'étayer les conclusions de ce dernier sur la formation de mitochondries nouvelles par croissance et scission des mitochondries préexistantes.

4-4-3. Synthèse de l'ADN mitochondrial.

Nous avons montré qu'il n'y a pas de différence significative dans le marquage mitochondrial dans la souche GL quel que soit l'état du macronoyau et dans la souche 1 quel que soit celui du macronoyau et du micronoyau.

Dans la plupart des cas où on rapporte une

augmentation de l'intensité de la synthèse mitochondriale à la phase S nucléaire, et des synthèses synchronisées soit totalement, soit partiellement, il s'agit d'organismes ayant subi un choc trophique (Parsons, 1965, Stone et Miller, 1965, Cameron, 1966, Moustacchi et Williamson, 1966, Calvayrac et Coll., 1972, Cottrel et Avers, 1970). Par contre, chez *Physarum polycephalum* syncitium synchrone naturellement, la synthèse de l'ADN mitochondrial est totalement indépendante de la synthèse de l'ADN nucléaire (Guttes et Coll., 1967).

La synthèse continue que nous constatons s'applique à l'ensemble du chondriome (Charret et André, 1968). Mais nous ne savons pas si elle est discontinue à l'échelle mitochondrie et asynchrone dans les mitochondries d'une même cellule, ou continue dans chaque mitochondrie comme elle l'est dans les Bactéries en croissance rapide (Mc Fall et Stent, 1959, Schaechter et Coll., 1959). Pica-Mattoccia et Attardi (1972) ont calculé que dans des cellules Hela, quelle que soit l'hypothèse que l'on fasse sur la réplication de l'ADN mitochondrial, c'est à dire, soit une réplication à peu près simultanée des 6 molécules, soit leur réplication successive, sa durée est inférieure aux phases S et G_2 du cycle cellulaire. C'est un argument en faveur d'une réplication discontinue de l'ADN de chaque mitochondrie.

Chez le Trypanosome, où le kinétoplaste représente l'unique locus de l'ADN mitochondrial, la phase de synthèse de l'ADN nucléaire et celle de l'ADN kinétoplastique sont rigoureusement synchrones. Il est important pour la conservation de la lignée que les deux synthèses soient accordées, le kinétoplaste unique se divisant en même temps que la cellule. Chez *Tetrahymena pyriformis*, il y a un grand nombre de mitochondries, chacune possèdant un stock d'ADN. Elles sont suffisamment nombreuses pour que leur distribution soit assurée dans les cellules filles à chaque

cytodiérèse. Il ne paraît pas évolutivement aussi important que chez le Trypanosome que la synthèse de l'ADN mitochondrial et la division des mitochondries soient accordées à celles du ou des noyaux.

4-4-4. Stabilité de l'ADN mitochondrial.

Les expériences effectuées pour étudier la dilution de la radioactivité de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire initialement marqués, indiquent qu'ils sont stables pour au moins 9 générations. Nous avons considéré le nombre de générations cellulaires, car avant d'entrer en phase stationnaire proprement dite, la culture passe par une phase intermédiaire où la croissance se ralentit. Tant qu'il y a des divisions, il y a une synthèse d'ADN conduisant à un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle cellulaire. Ce doublement est la somme de toutes les synthèses d'ADN au sein des mitochondries. Entre chaque cytodiérèse et de façon asynchrone pour la population , les mitochondries retrouvent leur quantité initiale d'ADN.

En phase stationnaire, lorsque les divisions ont cessé et c'est le cas de la culture lors des expériences 8 et 9, la radioactivité de l'ADN ne devrait pas varier, si l'ADN est stable. Or on constate une diminution de la radioactivité de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire et la comparaison de leurs moyennes en 8 et 9 indique que la différence est significative pour l'ADN mitochondrial alors qu'elle ne l'est pas pour l'ADN nucléaire. Il y a une perte de radioactivité dans l'ADN mitochondrial au cours de la phase stationnaire. Nous savons que la quantité d'ADN dans les mitochondries n'est pas différente quelle que soit la phase de la culture; donc,la diminution de la radioactivité n'est pas due à une dégradation de l'ADN mitochondrial, mais à un renouvellement. Ceci est confirmé par la très faible radioactivité observée par autoradiographie au microscope électronique après un marquage à la thymidine ^{3}H de cellules en phase stationnaire (observations non publiées).

Il est difficile de savoir si le renouvellement n'apparaît qu'au cours de la phase stationnaire ou bien s'il existe déjà au cours de la phase de croissance pendant laquelle il serait masqué par les synthèses.

Neubert et Coll. (1968) ont étudié le renouvellement de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire dans des tissus de Vertébrés. Ils voient un rapport entre le renouvellement de l'ADN et le taux de division cellulaire; par exemple, dans le foie de rat adulte, la demi vie de l'ADN mitochondrial est de 7 à 10 jours (celle de l'ADN nucléaire est supérieure à 100 jours), alors que chez des rats en croissance, la demi vie est supérieure à 15 jours; dans un hépatome à croissance rapide la demi vie atteint 80 jours. Plus le taux de croissance de la population cellulaire est élevé, moins le renouvellement de l'ADN est notable. Neubert et Coll. interprétent le faible taux de renouvellement dans des cellules à croissance rapide, comme dû au fait qu'un besoin accru, dans la formation de certains composants mitochondriaux, est en premier lieu satisfait par une augmentation de la stabilité de ces composants, plutôt que par une augmentation de leur taux de synthèse. Dans des expériences très voisines de celles de ces auteurs, Gross et Coll. (1969) étudient le renouvellement des phospholipides mitochondriaux et le comparent avec celui de l'ADN; ils constatent un renouvellement de l'ADN mitochondrial; sa demi vie varie avec les tissus observés qui sont toujours des tissus au repos.

On peut assimiler une culture de *Tetrahymena pyriformis* en phase stationnaire à un tissu au repos, c'est à dire à un tissu où l'index mitotique est nul. Ceci est vrai pour les 30 heures qui suivent la fin des divisions dans la culture de Ciliés. Il y a un renouvellement de l'ADN mitochondrial. D'autres expériences sont nécessaires pour mesurer sa demi vie; mais il est permis de dire, à partir des résultats obtenus, que sa demi vie est inférieure à celle de l'ADN nucléaire, ce qui est en accord avec les observations faites par Neubert et coll. (1968) dans d'autres cellules.

5. QUELQUES ASPECTS DE LA FONCTION DE L'ADN MITOCHONDRIAL.

Les ribosomes mitochondriaux sont d'observation courante (André et Marinozzi, 1965, Swift, 1965, Swift et Coll., 1964) et leur association en polysomes (Vignais et Coll., 1969, 1972), est le signe cytologique de la synthèse protéique mitochondriale. Les nombreuses données biochimiques sur cette question (Allen et Suyama, 1972, Avadhani et Buetow, 1972, Avadhani et Coll., 1972; revues par Roodyn et Wilkie, 1968, Borst et Grivell,1971, Beattie, 1971) sont ainsi corroborées par des observations directes. On sait que les ARN ribosomaux sont dûs au fonctionnement de deux gènes mitochondriaux (Aloni et Attardi, 1971a, 1971b, Dawid, 1972). On a d'autre part mis en évidence certains ARN de transfert mitochondriaux différents de ceux du cytoplasme (Barnett et Brown, 1967, Epler, 1969 et Brown et Novelli,1968 chez *Neurospora crassa*, Buck et Nass, 1968, 1969, Nass et Buck, 1969, 1970 dans le foie de rat, Accoceberry et Stahl, 1971, Casey et Coll.,1972 chez la levure, Suyama et Eyer, 1968 chez *Tetrahymena*).Dans cet organisme, Suyama (1969) estime que le pourcentage maximum d'hybridation de 0,7% entre l'ADN mitochondrial et l'ARN de transfert permet d'accorder à l'ADN mitochondrial du Cilié 10 gènes pour 10 espèces d'ARN de transfert. L'ARN messager mitochondrial, quant à lui, a une origine toujours discutée (Wintersberger,1966, Suyama et Eyer, 1968, Suyama, 1969, Allen et Suyama, 1972, Borst, 1971).

Au système transcripteur mitochondrial (Wintersberger 1966, Fukuhara, 1967, Curgy, 1970, Aloni et Attardi, 1972) fait probablement suite un système traducteur mitochondrial propre. Un bon nombre d'arguments conduisent à penser que certaines protéines de la membrane interne mitochondriale sont traduites *in situ* (Coote et Work, 1971, Neupert et Ludwig, 1971, Borst, 1971, Schatz et Coll., 1972, revue par Schatz, 1970), mais l'insuffisance de l'information génétique contenue dans la

mitochondrie implique un apport des gènes nucléaires et une coopération entre noyau et mitochondrie; c'est le cas de la cytochrome oxydase (Weiss et Coll., 1971, Weiss 1972a), du cytochrome b (Weiss, 1972b) et du complexe ATPase-sensible à la rutamycine (Tzagoloff et Coll., 1972).

Nous nous proposons dans ce chapitre d'une part, de visualiser la transcription et la traduction dans les mitochondries, d'autre part, d'étudier la synthèse de l'ADN mitochondrial et de suivre parallèlement les modifications des mitochondries après un traitement au bromure d'éthidium.

5-1- VISUALISATION DE LA TRANSCRIPTION ET DE LA TRADUCTION DANS LES MITOCHONDRIES.

Nous avons appliqué à des mitochondries la technique imaginée par Miller pour visualiser le fonctionnement des gènes nucléolaires de l'ovocyte de Batraciens et la traduction et la transcription dans les Bactéries.

5-1-1. Résultats

Les ribosomes mitochondriaux sont bien visibles dans les mitochondries sur coupes de cellules en phase de croissance exponentielle, après une double fixation glutaraldéhyde-acide osmique, et une double coloration uranyle-plomb (fig.2). Ils sont encore plus évidents après une fixation simple à la glutaraldéhyde d'un culot de mitochondries isolées et une coloration des coupes à l'hydroxyde de plomb (fig.37).

Sur des préparations effectuées suivant la technique de Miller, l'ADN adsorbé sur le film de carbone se présente sous la forme de filaments rectilignes, les plus longs mesurant de 10 à 12 µ dispersés autour des débris des membranes mitochondriales (fig.39). Il n'est pas rare que ces filaments soient parallèles entre eux ou forment des réseaux sur lesquels des fragments de crêtes et de membranes restent attachés. Leur longueur totale, variable d'une préparation

à l'autre, car certaines parties sont masquées, est de plusieurs dizaines de microns par mitochondrie.

La technique utilisée étire les molécules, mais elle provoque aussi leur accolement, qui se reconnaît à une plus grande épaisseur des filaments. Ceci s'observe surtout au voisinage des résidus mitochondriaux où la concentration en ADN est élevée (fig.39). L'accolement des molécules n'est généralement pas total sur toute leur longueur; des molécules accolées peuvent se disjoindre à un certain endroit, et, éventuellement, s'accoler plus loin à d'autres. Ces raccordements se présentent comme des bifurcations d'où partent des ramifications rectilignes, longues de plusieurs microns. Le cas le plus simple est réalisé lorsque deux molécules seulement sont en jeu. Dans ce cas, les deux doigts sont symétriques et d'égale épaisseur; le manche est notablement plus épais (bas de la figure 40). Des cas plus complexes sont réalisés. La figure 44, par exemple, montre un tronc de 4 molécules qui se divise dichotomiquement à deux reprises. D'autres troncs se divisent de façon non symétrique, donnant des branches d'inégale épaisseur. Nous qualifions ces différentes ramifications de *longues*.

En dehors des figures que l'on vient de décrire, qui sont très courantes, on observe, avec une fréquence moindre, des ramifications d'un autre type (haut de la figure 39 et figures 41, 42 et 43). Le long d'un filament rectiligne d'ADN qui paraît n'être constitué que d'une seule molécule, on peut voir s'écarter une ramification *courte*, formée par un filament plus grêle et moins rigide que celui sur lequel elle s'insère et dont l'implantation est presque perpendiculaire au filament d'ADN. Ce dernier est d'épaisseur constante de part et d'autre du point d'insertion. Les plus longues de ces ramifications mesurent 0,5 µ.

Les ribosomes restent groupés près des débris mitochondriaux. On les observe en semis diffus dans lesquels il est difficile de déceler des alignements (fig.38); par

contre, lorsqu'ils sont plus dispersés (fig.45), on les voit souvent alignés le long d'un filament grêle, par groupes de 3 à 5, à peu près équidistants (fig.46, 47 et 48). Nous interprétons le filament comme une molécule d'ARN messager, et l'ensemble comme un polysome que la centrifugation a respecté. Bien que ces polysomes soient souvent situés à proximité des débris mitochondriaux et de l'ADN qui s'y rattache, nous n'avons jamais observé de connexion entre cet ADN et le filament d'ARN messager.

5-1-2. Discussion

La quantité d'ADN par mitochondrie observée avec la technique de Miller est du même ordre de grandeur que celle mesurée avec la technique de Kleinschmidt (Frielfelder et Kleinschmidt, 1965), soit une longueur d'environ 110 µ par mitochondrie (Suyama et Miura, 1968, Charret, 1970).

Les filaments d'ADN, étirés et accolés, présentent de nombreuses ramifications. Pour la plupart d'entre elles, que nous qualifions de *longues*, la différence d'épaisseur entre le rameau principal et les doigts de la fourche exclut l'interprétation d'une réplication. Dans celles que nous qualifions de *courtes*, on constate que l'épaisseur du filament d'ADN sur lequel est implantée la ramification est uniforme. Ce fait, ainsi que la valeur élevée de l'angle de raccordement sont de solides indices que la molécule qui forme la ramification n'est pas en continuité avec la molécule d'ADN, et n'est donc probablement pas de même nature qu'elle. Cette interprétation est renforcée par l'aspect sinueux de la ramification, qui contraste avec la rigidité des filaments d'ADN. Pour cette raison, les ramifications courtes peuvent être interprétées comme des molécules d'ARN en transcription. Les plus longues d'entre elles peuvent correspondre à des ARN messagers ou ribosomaux. Si on admet en effet que ces ARN ont une structure en simple chaîne, les bases étant complètement empilées, c'est à dire distantes

de 3,4 Å, la masse d'une molécule longue de 0,5 μ est de $4,8.10^5$ daltons. Cette masse, quoique faible, n'est pas incompatible avec celle des ARN ribosomaux ou messagers. S'agissant d'un messager, l'information contenue dans une telle molécule correspondrait à la synthèse d'une chaîne polypeptidique de 60 000 de poids moléculaire.

Contrairement à Miller et Coll. (1970) pour les Bactéries, nous n'avons jamais observé de polysomes rattachés aux molécules d'ADN. L'origine de l'ARN messager mitochondrial est encore très imprécise (Wintersberger, 1966, Suyama et Eyer, 1968, Suyama, 1969, Borst, 1971, Allen et Suyama,1972). Dans le cas où les ramifications courtes que nous observons sont de l'ARN messager transcrit dans la mitochondrie, on peut concevoir que cet ARN se détache de l'ADN après la transcription et se charge ensuite de ribosomes, comme c'est le cas des ARN messagers d'origine nucléaire. Néanmoins, il est encore possible que ce soit notre traitement qui soit responsable du détachement des polysomes. Si au contraire, l'ARN messager est d'origine nucléaire, il ne pourrait évidemment être rattaché à l'ADN mitochondrial. Que l'ARN messager provienne ou non d'une transcription de l'ADN mitochondrial, les polysomes s'observent presque toujours à proximité des membranes mitochondriales. Ceci est en accord avec les observations faites sur coupes qui montrent que les ribosomes sont situés de préférence contre la membrane interne et les crêtes (André et Marinozzi, 1965, Swift, 1965, Stelly et André, 1972).

La comparaison des processus de la synthèse protéique, notamment l'action des inhibiteurs, fournit des arguments en faveur d'une similitude de fonctionnement entre la bactérie et la mitochondrie (Raff et Mahler, 1972, revue par Nass, 1969). Toutefois, la séquence temporelle des évènements n'est pas nécessairement la même, et nos observations ne nous permettent pas de déterminer si, dans la mitochondrie, trancription et traduction sont simultanées comme dans la bactérie, ainsi que Miller et Coll. (1970) l'ont très clairement visualisé.

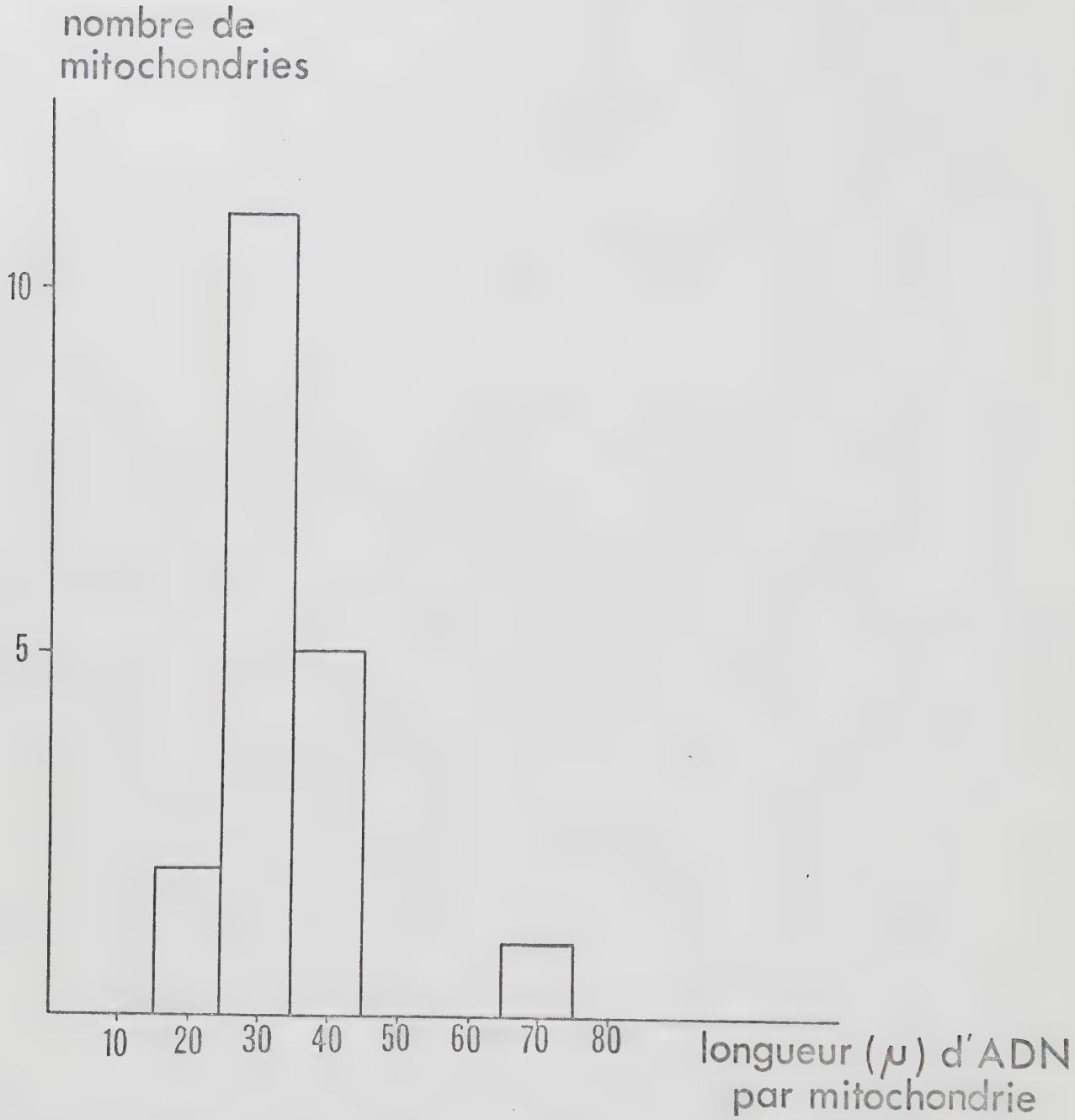


Figure XI - *Histogramme représentant la distribution de la longueur totale d'ADN par mitochondrie de cellules traitées au Bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml.*

5-2. EFFET DU BROMURE D'ETHIDIUM

Le bromure d'éthidium, connu pour inhiber de façon spécifique la synthèse de l'ADN kinétoplastique,a été utilisé dans le but d'étudier son effet sur l'ADN mitochondrial. Une partie de ce travail a fait l'objet de la publication 2 citée en annexe. Nous en rappelerons les résultats. Les observations rapportées dans le présent travail concernent notamment la quantité d'ADN dans les cellules traitées et l'effet réversible du bromure d'éthidium.

5-2-1. Résultats

5-2-1-1. Synthèse d'ADN et modifications des mitochondries

En présence de bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml, la synthèse de l'ADN mitochondrial est inhibée à 85%, alors que pour cette dose, celle de l'ADN nucléaire ne semble pas atteinte. Cette inhibition s'accompagne de modifications importantes des mitochondries qui deviennent plus petites, plus nombreuses et s'appauvrissent en crêtes.

5-2-1-2. Isolement des mitochondries des cellules traitées et mesure de la longueur de leur ADN

Les mitochondries sont isolées de cultures traitées 24 heures avec du bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml (fig.49). Sur des coupes de culot, les mitochondries sont plus petites que celles des cellules non traitées et montrent les trois types de structure déjà constatés chez ces dernières avec cependant des crêtes réduites (fig.50). Les mitochondries sont lysées par choc osmotique et préparées selon la technique de Kleinschmidt. L'ADN reste au voisinage de la mitochondrie dont il est originaire (fig. 51 et 52). Les longueurs d'ADN total de 21 mitochondries ont été mesurées et sont rassemblées sur un histogramme (fig. XI). 11 mitochondries contiennent entre 25 et 35 µ d'ADN, le maximum étant 30 µ.

Bromure d'éthidium	% de mitochondries radioactives	Nombre de grains/100 μ^2
6 heures	39,7 $\pm$ 3,5	150,42 $\pm$ 1,4
12 heures	35,5 $\pm$ 3,4	192,02 $\pm$ 2,0

TABLEAU 10. *Intensité du marquage des mitochondries exprimée en pourcentage de mitochondries radioactives et concentration de radioactivité exprimée en grains d'argent par 100 μ^2 de surface mitochondriale. Cellules traitées 6 h. et 12 h. par le bromure d'éthidium (20 µg/ml), puis lavées et marquées 6 h. avec de la thymidine ^3H d'activité spécifique 25 Ci/mM, à la dose de 100 µCi/ml.*

Temps \ Nombre de grains	0	1	2	3	4	χ^2
BET 6 h.	454	196	78	25	1	22,5>7,81
Thymidine ^3H 6 h.	425,70	243,3	69,5	13,24		n = 3
BET 6 h.	502	195	64	14	2	10,58>7,81
Thymidine ^3H 6 h.	478,02	230,34	55,48	8,9		n = 3

TABLEAU 11. *Distribution des nombres de grains d'argent observés par mitochondrie, comparée à la distribution de Poisson correspondante dans des cellules traitées au Bromure d'éthidium 6 h. et 12 h. lavées et remises en culture avec de la thymidine ^3H pendant 6 h.*

5-2-1-3. Réversibilité

Des cellules traitées 18 heures au bromure d'éthidium et remises en cultures montrent après 6 heures de croissance en absence de colorant, des mitochondries altérées (fig.53), après 24 heures, des mitochondries à crêtes normales (fig.54). Dans ces dernières mitochondries, on note la présence de ribosomes.

Nous n'avons pas fait l'étude systématique de la réversibilité, mais nous avons cherché à savoir comment reprend la synthèse de l'ADN mitochondrial. Pour cela, les cellules ont été traitées par le bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml pendant 6 heures et 12 heures puis lavées pour éliminer le colorant et remises en culture sur du milieu frais auquel on ajoute de la thymidine ^{3}H à la concentration habituelle. Le marquage est de 6 heures. Le dénombrement des mitochondries marquées et le comptage des grains après l'autoradiographie de telles cellules donnent les résultats rassemblés sur le tableau 10.

Les pourcentages de mitochondries marquées ne diffèrent pas significativement. Par contre, la concentration en radioactivité est plus élevée dans les cellules prétraitées 12 heures, c'est à dire que chaque mitochondrie est plus radioactive, le temps de marquage étant le même dans les deux cas. De plus, les concentrations en radioactivité sont très nettement supérieures à celles notées dans des cellules témoin avec des temps de marquage égaux ou supérieurs à 12 heures (109,66 grains/100 μ^2, voir publication 2 en annexe). Nous avons également comparé la distribution expérimentale des grains d'argent sur les mitochondries, à une distribution théorique de Poisson. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11.

5-2-2. Discussion

5-2-2-1. Modifications mitochondriales

Les trois types de structure mitochondriale observés

dans les culots de cellules traitées ne semblent pas être l'expression de réactions différentes au colorant de la part des mitochondries comme l'on conclu Heilporn et Limbosch (1971) chez *Acetabularia*; en effet, nous avons déjà observé les mêmes différences dans des culots de mitochondries normales. Ce sont des variations tout à fait comparables. L'essentiel est qu'après un traitement au bromure d'éthidum, les mitochondries sont plus petites et possèdent moins de crêtes.

5-2-2-2. ADN des mitochondries des cellules traitées.

Une solution d'acétate d'ammonium 2M est suffisante pour obtenir la lyse des mitochondries par choc osmotique et conserver l'ADN autour des membranes mitochondriales. La structure simplifiée des mitochondries des cellules traitées facilite probablement l'expulsion et la dispersion de la matrice.

Alors que dans une mitochondrie normale, il y a 100 à 110 µ d'ADN, on n'en trouve que 25 à 35 µ dans les mitochondries de cellules traitées. Cette observation indique que la synthèse de l'ADN mitochondrial est inhibée en partie par le bromure d'éthidium. La synthèse partielle d'ADN est insuffisante pour assurer aux mitochondries dont la multiplication persiste,une quantité normale d'ADN; celle-ci diminue mais pas suffisamment pour que les mitochondries s'en trouvent dépourvues, dans l'intervalle de temps considéré, sachant qu'il a une division cellulaire au cours de cette période (Charret, 1972).

5-2-2-3. Réversibilité.

La croissance de cultures traitées au bromure d'éthidium (24 heures maximum dans les expériences décrites ici) reprend dès que les cellules sont remises en culture dans un milieu dépourvu de colorant. On constate également un changement dans la structure des mitochondries. Dès 6 heures de croissance en milieu normal, on voit déjà dans les mitochondries encore dépourvues de crêtes, quelques ribosomes;

après 18 heures, les ribosomes ont réapparu et les crêtes sont normales.

En ce qui concerne l'ADN, l'autoradiographie nous fait constater dans de telles mitochondries en récupération, une synthèse importante d'ADN que traduisent des concentrations en radioactivité très supérieures à celles que l'on observe dans des témoins non traités. A la remise en culture sur du milieu frais sans colorant, il se produit un choc trophique et il se déclenche une forte synthèse de l'ADN mitochondrial.

Malgrè la différence significative indiquée par le test χ^2 entre les nombres observés et les nombres théoriques calculés dans le cas d'une distribution de Poisson, nous considérons la distribution des grains d'argent sur les mitochondries des cellules en récupération comme due à un phénomène aléatoire (voir discussion paragraphe 4-4-2). Lors de la reprise de la synthèse d'ADN, toutes les mitochondries se comportent de façon identique, il n'y a pas deux populations différentes.

A l'élimination du bromure d'éthidium du milieu de culture et à la remise des cellules sur un milieu frais, le complexe ADN-colorant se rompt et l'ADN mitochondrial retrouve sa structure normale. D'après Westergaard et Coll. (1970, 1972) le bromure d'éthidium provoque la production dans les cellules traitées d'une très grande quantité d'ADN polymérase mitochondriale (50 fois plus que dans des cellules normales). Ces auteurs concluent à une induction de la synthèse d'ADN polymérase mitochondriale par le colorant. Dans des cellules traitées et préparées pour la récupération il y a donc une grande quantité d'enzyme disponible pour la reprise de la synthèse de l'ADN mitochondrial, ce qui peut expliquer le concentration très élevée de radioactivité que l'on observe.

Dans les mitochondries modifiées, il n'y a plus d'obstacle après l'élimination du bromure d'éthidium, au fonctionnement de l'ADN polymérase. La réapparition des

ribosomes laisse supposer que les séquences codant pour les ARN ribosomaux mitochondriaux ont fonctionné. Au début de la phase de récupération, chaque mitochondrie, bien qu'ayant moins d'ADN que des mitochondries normales (il n'y a plus de synthèse et les mitochondries se divisent) en possèdent encore suffisamment pour réamorcer une synthèse. Et les observations que nous avons faites sur la structure des mitochondries en cours de récupération laissent supposer que la matrice d'ADN utilisée lors de la reprise des synthèses, conserve intactes, sinon toutes ses séquences, au moins celles nécessaires à la transcription de l'ARN ribosomal. Chaque mitochondrie est capable de retrouver son état normal. La transcription et la traduction reprennent, permettant la synthèse de la ou des protéines qui selon la conception de Malher et Coll. (1971), interviennent dans l'édification de la membrane interne. Chaque mitochondrie a le même potentiel de récupération. Ce fait est corroboré par l'homogénéité morphologique de la population mitochondriale aussi bien lors du traitement que lors de la récupération. Ces observations tendent à prouver que chaque mitochondrie réagit de façon identique à l'action du colorant.

Il ne faut pas cependant négliger l'effet que peut avoir le bromure d'éthidium sur la physiologie de la cellule puisque le temps de génération s'allonge et que les cellules ne font environ qu'une division en présence de colorant. L'autoradiographie montre que la synthèse de l'ADN nucléaire n'est pas touchée et que les noyaux poursuivent la phase dans laquelle ils sont engagés (Charret, 1972). Sans modifier la synthèse de l'ADN nucléaire, il n'est pas impossible que le bromure d'éthidium au bout d'un certain temps agisse sur la caryocinèse en bloquant les divisions comme Risueno et Coll. (1971) l'ont observé dans le méristème d'*Allium cepa*.

Nous avons également constaté que le nombre de mitochondries augmente au cours du traitement au bromure

d'éthidium, alors que la cellule ne se divise plus. Une explication possible est celle d'une perturbation dans le système des interrelations noyau-mitochondrie. Il est indispensable que le nombre de mitochondries soit régulé par le noyau afin de le maintenir à peu près constant dans la cellule à travers les générations cellulaires. Les résultats que nous obtenons s'intègrent dans le schéma proposé par Turner et Lloyd (1971) puis complété par Barath et Kuntzel (1972). Selon ce schéma, dans une cellule normale le noyau gouvernerait la synthèse d'une protéine initiatrice de la synthèse de l'ADN mitochondrial entraînant de façon subséquente la division de la mitochondrie. La synthèse de l'ADN est dépendante de l'ADN polymérase qui est codée par le noyau, comme le seraient également les autres protéines impliquées dans le fonctionnement de l'appareil génétique mitochondrial. La mitochondrie régulerait elle-même ce processus en assurant la synthèse d'une protéine de type répresseur. Dans un système perturbé par le bromure d'éthidium notamment, l'ADN nucléaire non affecté par le colorant continue de transcrire et de faire traduire la protéine initiatrice, ainsi que l'ADN polymérase; le répresseur d'origine mitochondrial n'est plus traduit et les mitochondries se divisent.

6. RESUME

Comme tous les Eucaryotes communs étudiés à ce jour sous ce rapport, *Tetrahymena pyriformis* possède de l'ADN dans ses mitochondries. Nous avons mis à profit le fait que le cycle de T.p. est bien connu et qu'il est facile d'obtenir des cultures axéniques, pour entreprendre l'étude de l'ADN de ses mitochondries. Notre travail porte sur l'étude de la morphologie de ses molécules, sur les modalités de sa synthèse et sur quelques aspects de sa fonction.

L'ADN mitochondrial est visible au microscope électronique *in situ* dans la cellule fixée comme il l'est dans presque toutes les mitochondries de cellules d'Eucaryotes. Après une lyse osmotique, les mitochondries laissent échapper des molécules linéaires de 15 µ ce qui correspond à un poids moléculaire de 30.10^6 daltons. Ces résultats sont voisins de ceux de Suyama et Miura qui ont obtenu après extraction chimique, des molécules de 17 µ. La mise en évidence d'une classe prépondérante de molécules linéaires de 15 µ est en accord avec les résultats de Flavell et Jones qui, après dénaturation et renaturation de l'ADN mitochondrial estiment sa complexité génétique à 30.10^6 daltons. La lyse par choc osmotique permet de conserver la quasi totalité de l'ADN groupé autour des débris de la mitochondrie. Nous avons ainsi mesuré la longueur de l'ensemble des molécules : une mitochondrie possède de 100 à 110 µ d'ADN, soit un poids moléculaire de l'ordre de 2.10^8 daltons. Cette quantité est supérieure à celle d'une mitochondrie de foie où elle est estimée à 7.10^7 daltons.

La mise en évidence de l'existence de molécules circulaires se généralise pour les mitochondries d'organes variés d'Eucaryotes ; *Tetrahymena pyriformis* fait exception à cette règle.Cependant nous avons obtenu quelques molécules

présentant des portions vrillées semblables à celles que l'on observe sur les molécules circulaires fermées par liaison covalente. Ce fait semble constituer une présomption que l'ADN mitochondrial de *Tetrahymena* est circulaire. En toute vraisemblance, la complexité de structure de la mitochondrie dont les nombreuses crêtes tortueuses encombrent la matrice, ne permet pas de conserver intacte la molécule lors de son extraction.

La synthèse de l'ADN mitochondrial a été étudiée par autoradiographie au microscope électronique. La disposition particulière des mitochondries à la périphérie de la cellule sous le cortex, permet de distinguer sans ambiguité la radioactivité provenant des noyaux de celle provenant des mitochondries.

Dans des cellules en phase exponentielle de croissance, la synthèse de l'ADN est continue dans la population mitochondriale au cours du cycle cellulaire, que le macronoyau comme le micronoyau soit ou non, en phase S. Une telle continuité semble le cas général dans un bon nombre de systèmes cellulaires. Elle n'exclut pas la possibilité pour chaque mitochondrie, de synthétiser l'ADN de manière discontinue. Dans ce cas, les phases de synthèse des individus-mitochondries seraient synchrones de telle sorte que leur ensemble présente une synthèse continue. Le grand nombre de mitochondries par cellule permet au Cilié d'assurer sans difficulté l'héritage des cellules filles en mitochondries en dépit de cette asynchronie et de l'indépendance apparente vis à vis du noyau. Chez le Trypanosome au contraire, il est indispensable pour le maintien de la lignée que la synthèse de l'ADN kinétoplastique et celle de l'ADN nucléaire soient synchrones, leur division l'étant aussi.

L'étude de la dilution de la radioactivité de l'ADN mitochondrial de cellules initialement marquées puis cultivées en milieu froid montre que l'ADN mitochondrial est stable

pendant la phase exponentielle de croissance et dans la période de transition qui lui fait suite. Dans une culture en phase stationnaire la stabilité de l'ADN semble diminuer et on peut interpréter le phénomène comme un renouvellement identique à celui que l'on constate dans des tissus au repos.

La synthèse de l'ADN mitochondrial est inhibée à 85 % par le bromure d'éthidium, à la dose de 20 µg/ml, alors que celle de l'ADN nucléaire n'est pas modifiée. Cette inhibition s'accompagne de profondes modifications des mitochondries qui deviennent plus petites et plus nombreuses, qui s'appauvrissent en crêtes, dont la matrice devient moins opaque aux électrons, et dont les ribosomes disparaissent. La disparition des ribosomes confirme que la transcription des ARN ribosomaux mitochondriaux est perturbée par le bromure d'éthidium. Les modifications importantes qui affectent la membrane interne et les crêtes sont le signe que la construction de la membrane est altérée. Ceci peut survenir à la suite d'une traduction défectueuse d'une protéine à fonction d'intégration et de régulation qui selon la conception de Mahler contrôlerait l'édification de la membrane interne.

L'augmentation du nombre de mitochondries au cours du traitement au bromure d'éthidium et l'inhibition de la synthèse de l'ADN entraînent une diminution de la quantité d'ADN par mitochondrie. L'effet du bromure d'éthidium est réversible. Après son élimination, il y a une forte synthèse d'ADN au cours de laquelle toutes les mitochondries réagissent de la même façon. Elles retrouvent peu à peu des ribosomes et une structure normale avec des crêtes bien développées. On peut en déduire qu'il reste dans chaque mitochondrie au moins une molécule d'ADN capable de se répliquer et d'assurer la restauration de l'état normal. La transcription et la traduction reprennent, permettant la synthèse de la ou des protéines intervenant dans l'édification de la membrane interne.

Les nombreuses données biochimiques de la synthèse protéique mitochondriale sont corroborées par l'observation au microscope électronique de ribosomes associés en polysomes dans les mitochondries de certaines cellules dont *Tetrahymena*. Nous avons appliqué à T.p., la technique imaginée par Miller pour visualiser le fonctionnement des gènes nucléolaires d'ovocytes de Batraciens et la transcription et la traduction chez les Bactéries.

Cette technique montre l'ADN sous la forme de longs filaments rectilignes sur lesquels sont implantés des filaments plus courts et sinueux que nous interprétons comme de l'ARN en transcription. Les ribosomes qui sont très nombreux restent parfois groupés en polysomes de 3 à 5 unités visibles le long d'un ARN messager. Ces polysomes sont situés au voisinage des résidus de mitochondries et de l'ADN qui s'y attache, mais nous n'avons jamais observé l'ARN messager raccordé à l'ADN.

La présence de polysomes est une preuve directe de la synthèse protéique mitochondriale, mais elle ne permet pas de déterminer quelle est l'origine de l'ARN messager et nous ne pouvons reconnaitre si dans les mitochondries transcription et traduction sont simultanées comme chez les Bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

ACCOCEBERRY B. & STAHL A., 1971. Chromatographic differences between the cytoplasmic and the mitochondrial t-RNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, *42*, 1235-1243.

AGSTERIBBE E., KROON A.M. & VAN BRUGGEN E.F.J., 1972. Circular DNA from mitochondria of *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, *269*, 299-303.

ALBACH R.A., 1967. Incorporation of tritium from thymidine-methyl-H^3 into DNA, RNA, lipids and protein in logarithmic and stationary phase *Tetrahymena pyriformis* strain W. *J. Protozool.*, *14*, 271-277.

ALONI Y. & ATTARDI G., 1971a. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. II. Evidence for complete transcription of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, *55*, 251-270.

ALONI Y. & ATTARDI G., 1971b. Symmetrical *in vivo* transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, *68*, 1757-1761.

ALONI Y. & ATTARDI G., 1972. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. XI. Isolation and characterization of transcription complexes of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, *70*, 363-373.

ALLEN N.E. & SUYAMA Y., 1972. Protein synthesis *in vitro* with *Tetrahymena* mitochondrial ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, *259*, 369-377.

ANDRE J. & MARINOZZI V., 1965. Présence, dans les mitochondries, de particules ressemblant aux ribosomes. *J. Microscopie*, *4*, 615-626.

ARNBERG A., VAN BRUGGEN E.F.J., TER SCHEGGET J. & BORST P., 1971. The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations. *Biochim. Biophys. Acta, 246,* 353-357.

ARNBERG A.C., VAN BRUGGEN E.F.J., SCHUTGENS R.B.H., FLAVELL R.A. & BORST P., 1972. Multiple D-loops in *Tetrahymena* mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta, 272,* 487-493.

AVADHANI N.G. & BUETOW D.E., 1972. Protein synthesis with isolated mitochondrial polysomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 46,* 773-778.

AVADHANI N.G., LYNCH M.J. & BUETOW D.E., 1972. Protein synthesis on polysomes in mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. *Exp. Cell Res., 69,* 226-228.

BAECKELAND E., CHEVREMONT-COMHAIRE S. & CHEVREMONT M., 1957. Dosages cytophotométriques d'acides désoxyribonucléiques (nucléaires et cytoplasmiques) dans des cellules traitées vivantes par une désoxyribonucléase acide. *Compt. Rend. Acad. Sci., 245,* 2390-2393.

BARATH Z. & KÜNTZEL H., 1972. Cooperation of mitochondrial and nuclear genes specifying the mitochondrial genetic apparatus in *Neurospora crassa. Proc. Nat. Acad. Sci., 69,* 1371-1374.

BARNETT W.E. & BROWN D.H., 1967. Mitochondrial transfer ribonucleic acids. *Proc. Nat. Acad. Sci., 57,* 452-458.

BEATTIE D.S., 1971. The synthesis of mitochondrial proteins. *Sub-cell. Biochem., 1,* 1-23.

BELL P.R. & MUHLETHALER K., 1964. Evidence for the presence of deoxyribonucleic acid in the organelles of the egg cells of *Pteridium aquilinum. J. Mol. Biol., 8,* 853-862.

BERGERON M. & DROZ B., 1969. Protein renewal in mitochondria as revealed by electron microscope radioautography. *J. Ultrastructure Res., 26,* 17-30.

BORST P., 1971. Size, structure and information content of mitochondrial DNA. In : *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts.* Boardman N.K., Linnane A.W. et Smillie R.M., ed., North Holland Publ. Co., Amsterdam, 260-266.

BORST P., 1972. Mitochondrial nucleic acids. *Annual Review of Biochem., 41,* 333-376.

BORST P. & KROON A.M., 1969. Mitochondrial DNA : physicochemical properties, replication, and genetic function. In : *Intern. Rev. Cytol., 26,* Bourne G.H. & Danielli J.F., ed., Acad. Press, New York, 108-190.

BORST P.A., KROON A.M. & RUTTENBERG G.J.C.M., 1967. Mitochondrial DNA and other forms of cytoplasmic DNA. In : *Genetic elements properties and function.* Shugar D., ed., Acad. Press, Londres, 81-116.

BORST P. & GRIVELL L.A., 1971. Mitochondrial ribosomes. *FEBS Letters, 13,* 73-88.

BRAUN R., & EVANS T.E., 1969. Replication of nuclear satellite and mitochondrial DNA in the mitotic cycle of *Physarum. Biochim. Biophys. Acta, 182,* 511-522.

BRAVERMAN G. & EISENSTADT J.M., 1964. DNA from the chloroplasts of *Euglena gracilis. Biochim. Biophys. Acta, 91,* 477-485.

BRESSLAU E. & SCREMIN L., 1924. Die Kerne der Trypanosomen und ihr Verhalten zur Nuclealreaktion. *Arch. Protistenk., 48,* 509-515.

BREWER E.N., DE VRIES A. & RUSCH H.P., 1967. DNA synthesis by isolated mitochondria of *Physarum polycephalum. Biochim. Biophys. Acta, 145,* 686-692.

BROWN D.H. & NOVELLI D.G., 1968. Chromatographic differences between the cytoplasmic and mitochondrial tRNAs of *Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Comm., 31,* 262-266.

BRYANT B.J., 1966. The incorporation of tritium from thymidine into proteins of the mouse. *J. Cell Biol., 29,* 29-36.

BUCK C.A. & NASS M.M.K., 1968. Differences between mitochondrial and cytoplasmic transfer RNA and aminoacyl transfer RNA synthetases from rat liver. *Proc. Nat. Acad. Sci., 60,* 1045-1052.

BUCK C.A. & NASS M.M.K., 1969. Studies on mitochondrial tRNA from animal cells. A comparison of mitochondrial and cytoplasmic tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol., 41,* 67-82.

BURTON K., 1965. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J., 62,* 315-323.

CALVAYRAC R., BUTOW R.A. & LEFORT-TRAN M., 1972. Cyclic replication of DNA and changes in mitochondrial morphology during the cell cycle of *Euglena gracilis*. *Exp. Cell Res., 71,* 422-432.

CAMERON I.L., 1966. A periodicity of tritiated-thymidine incorporation into cytoplasmic deoxyribomucleic acid during the cell cycle of *Tetrahymena pyriformis*. *Nature, 209,* 630-631.

CASEY J., COHEN M., RABINOWITZ M., FUKUHARA H. & GETZ G.S., 1972. Hybridization of mitochondrial transfer RNA's with mitochondrial and nuclear DNA of grande yeast. *J. Mol. Biol., 63,* 431-440.

CHARRET R., 1970. L'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis :* forme et taille des molécules. *Microscopie Electronique, III,* 1970, Grenoble, P. Favard éd., 161-162.

CHARRET R., 1972. Modification des mitochondries et synthèse de l'ADN mitochondrial de *Tetrahymena pyriformis* après action du bromure d'éthidium. *J. Microscopie, 14,* 279-298.

CHARRET R. & ANDRE J., 1968. La synthèse de l'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis*. Etude radioautographique quantitative au microscope électronique. *J. Cell Biol., 39,* 369-381.

CHARRET R. & FAURE-FREMIET E., 1967. Technique de rassemblement de microorganismes : préinclusion dans un caillot de fibrine. *J. Microscopie, 6,* 1063-1066.

CHEVREMONT M., BASSLER R. & BAECKELAND E., 1961. Nouvelles recherches sur les acides désoxyribonucléiques dans des cultures de fibroblastes refroidies puis réchauffées. Etude cytophotométrique et histoautoradiographique. Localisation cytoplasmique d'ADN. *Arch. Biol., 72,* 501-524.

CHUN E.H.L., VAUGHAN M.H. & RICH A., 1963. The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. *J. Mol. Biol., 7,* 130-141.

CLARK T.B. & WALLACE F.G., 1960. A comparative study of kinetoplast ultrastructure in the *Trypanosomidae*. *J. Protozool., 7,* 115-124.

CLAYTON D.A. & BRAMBL R.M., 1972. Detection of circular DNA from mitochondria of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 46,* 1477-1482.

COOTE J.L. & WORK T.S., 1971. Proteins coded by mitochondrial DNA of mammalian cells. *Eur. J. Biochem., 23,* 564-574.

COTTREL S.F. & AVERS C.J., 1970. Evidence of mitochondrial synchrony in synchronous cell cultures of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 38,* 973-980.

CURGY J.J., 1970. Incorporation *in vivo* et *in vitro* d'uridine ^{3}H dans l'ARN des mitochondries. *Exp. Cell Res., 62,* 359-367.

DALTON A.J., 1955. A chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anat. Rec., 121,* 281.

DAWID I.B., 1972. Mitochondrial RNA in *Xenopus laevis*. I. The expression of the mitochondrial genome. *J. Mol. Biol., 63,* 201-216.

DOBSON R.L. & COOPER M.F., 1971. Incorporation of radioactivity from thymidine into mammalian glucose and glycogen. *Biochim. Biophys. Acta, 254,* 393-401.

DROZ B., 1967. Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude radioautographique quantitative en microscopie électronique. *J. Microscopie, 6,* 201-228.

ELLIOTT A.M., TRAVIS D.M. & WORK J.A., 1966. An ultrastructural study of the effects of aeration and physical activity on aging in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Exp. Zool., 161,* 177-192.

EPLER J.L., 1969. The mitochondrial and cytoplasmic transfer RNA of *Neurospora crassa*. *Biochem., 8,* 2285-2290.

EVANS T.E., 1966. Synthesis of a cytoplasmic DNA during the G_2 interphase of *Physarum polycephalum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 22,* 678-683.

EVANS T.E. & SUSKIND D., 1971. Characterization of the mitochondrial DNA of the slime mold *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta, 228,* 350-364.

FLAVELL R.A. & JONES I.G., 1970. Mitochondrial deoxyribonucleic acid from *Tetrahymena pyriformis* and its kinetic complexity. *Biochem. J., 116,* 811-817.

FREIFELDER D. & KLEINSCHMIDT A.K., 1965. Single strand breaks in duplex DNA of coliphage T7 as demonstrated by electron microscopy. *J. Mol. Biol., 14,* 271-278.

FUKUHARA H., 1967. Informational role of mitochondrial DNA studied by hybridization with different classes of RNA in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci., 58,* 1065-1072.

GRANICK S. & GIBOR A., 1967. The DNA in chloroplasts, mitochondria and centrioles. In : *Progress in nucleic acids research and molecular biology*. Davidson J.N., Cohn W.E., ed., New York Academic Press, *Vol. 6,* 143-186.

GROSS N.J., GETZ G.S. & RABINOWITZ M., 1969. Apparent turnover of mitochondrial deoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat. *J. Biol. Chem., 244,* 1552-1562.

GROSS N.J. & RABINOWITZ M., 1969. Synthesis of new strands of mitochondrial and nuclear deoxyribonucleic acid by semiconservativ replication. *J. Biol. Chem., 244,* 1563-1566.

GUTTES E. & GUTTES S., 1964. Thymidine incorporation by mitochondria in *Physarum polycephalum*. *Science, 145,* 1057-1058.

GUTTES E.W., HANAWALT P.C. & GUTTES S., 1967. Mitochondrial DNA synthesis and the mitotic cycle in *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta, 142,* 181-194.

HACKENBROCK C.R., 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol., 30,* 269-297.

HALDAR D., FREEMAN K. & WORK T.S., 1966. Biogenesis of mitochondria. *Nature, 211,* 9-12.

HEILPORN V. & LIMBOSCH S., 1971. Les effets du bromure d'éthidium sur *Acetabularia mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta, 240,* 94-108.

HOFF-JORGENSEN E. & ZEUTHEN E., 1952. Evidence of cytoplasmic DNA in the Frog's egg. *Nature, 169,* 245-246.

HOLLENBERG C.P., BORST P., THURING R.W.J. & VAN BRUGGEN E.F.J., 1969. Size structure and genetic complexity of yeast mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta, 186,* 417-419.

IWASHIMA A. & RABINOWITZ M., 1969. Partial purification of mitochondrial and supernatant DNA polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta, 178,* 283-293.

KALF G.F., D'AGOSTINO M.A. & HUNTER G.R., 1971. DNA biosynthesis by isolated mitochondria stimulation by cytoplasmic factors from neoplastic and regenerating tissues. *Cancer Res., 31,* 2054-2058.

KALF G.F. & CH'IH J.J., 1968. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem., 243,* 4904-4916.

KALF G. & GRECE M., 1966. The isolation of DNA from lamb heart mitochondria. *J. Biol. Chem., 241,* 1019-1029.

KARNOVSKY M.J., 1961. Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J. Cell Biol., 11,* 729-732.

KAROL M.H. & SIMPSON M.V., 1968. DNA biosynthesis by isolated mitochondria : a replicative rather than a repair process. *Science, 162,* 470-473.

KASAMATSU H., ROBBERSON D.L. & VINOGRAD J., 1971. A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc. Nat. Acad. Sci., 68,* 2252-2257.

KELLENBERGER E., RYTER A. & SECHAUD J., 1958. Electron microscopy study of DNA-containing plasms II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 4,* 671-678.

KIRSCHNER R.H., WOLSTENHOLME D.R. & GROSS N.J., 1968. Replicating molecules of circular mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., 60,* 1466-1472.

KISLEV N., SWIFT H. & BOGORAD L., 1965. Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in Swiss chard. *J. Cell Biol., 25,* 327-344.

KROON A.M., 1971. Structure and function of mitochondrial nucleic acids. *Chimia, 25,* 114-121.

LARRA F. & DROZ B., 1970. Techniques radioautographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. *J. Microscopie, 9,* 845-880.

LEDUC E.H., BERNHARD W. & TOURNIER P., 1966. Cyclic appearance of atypical mitochondria containing DNA fibers in cultures of an adenovirus 12-induced hamster tumor. *Exp. Cell Res., 42,* 597-616.

LOEFER J.B., SMALL E.G. & FURGASON W.H., 1966. Range of variation in the somatic infraciliature and contractile vacuole pores of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool., 13,* 90-102.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem., 193,* 265-275.

LUCK D.J.L., 1963a. Formation of mitochondria in *Neurospora crassa*. A quantitative radioautographic study. *J. Cell Biol., 16,* 483-499.

LUCK D.J.L., 1963b. Genesis of mitochondria in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci., 49,* 233-240.

LUCK D.J.L., 1965. Formation of mitochondria in *Neurospora crassa*. A study based on mitochondrial density changes. *J. Cell Biol., 24,* 461-470.

LUCK D.J.L. & REICH E., 1964. DNA in mitochondria of *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci., 52,* 931-938.

MAHLER H.R., PERLMAN P.S., MEHROTRA B.D., 1971. Mitochondrial specification of the respiratory chain. In : *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*. Boardman N.K., Linnane A.W. & Smillie R.M., ed, North Holland Publ. Co., Amsterdam, 492-511.

McFALL E. & STENT G.S., Continuous synthesis of DNA in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta, 34,* 580-582.

MEYER H., MUSACCHIO M. & MENDONEN I., 1958. Electron microscope study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected time cultures and of blood agar forms. *Parasitology, 48,* 1-8.

MEYER R.R. & SIMPSON M.V., 1968. DNA biosynthesis in mitochondria : partial purification of a distinct DNA polymerase from isolated rat liver mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci., 61,* 130-137.

MILLER O.L. & BEATTY B.R., 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science, 164,* 955-957.

MILLER O.L., HAMKALO B.A. & THOMAS C.A., jr., 1970. Visualization of bacterial genes in action. *Science, 169,* 392-395.

MONNERON A. & BERNHARD W., 1966. Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en Epon. *J. Microscopie, 5,* 697-714.

MOUSTACCHI E. & WILLIAMSON D.H., 1966. Physiological variations in satellite components of yeast DNA, detected by density gradient centrifugation. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 23,* 56-61.

NASS M.M.K., 1966. The circularity of mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., 56,* 1215-1222.

NASS M.M.K., 1969. Mitochondrial DNA : advances, problems, and goals. *Science, 165,* 25-35.

NASS M.M.K. & BUCK C.A., 1969. Comparative hybridization of mitochondrial and cytoplasmic aminoacyl transfer RNA with mitochondrial DNA from rat liver. *Proc. Nat. Acad. Sci., 62,* 506-513.

NASS M.M.K. & BUCK C.A., 1970. Studies on mitochondrial tRNA from animal cells. II. Hybridization of aminoacyl-tRNA from rat liver mitochondria with heavy and light complementray strands of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol., 54,* 187-198.

NASS M.M.K. & NASS S., 1962. Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria. *Exp. Cell Res., 26,* 424-427.

NASS M.M.K. & NASS S., 1963a. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J. Cell Biol., 19,* 593-611.

NASS M.M.K., NASS S. & AFZELIUS B.A., 1965a. The general occurrence of mitochondrial DNA. *Exp. Cell Res., 37,* 516-539.

NASS S., 1969. The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria. In : *International Review of Cytology, 25,* Bourne G.H. & Danielli J.F., ed., Acad. Press, New York, 55-129.

NASS S. & NASS M.M.K., 1963b. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J. Cell Biol., 19,* 613-629.

NASS S., NASS M.M.K. & HENNIX U., 1965b. Deoxyribonucleic acid in isolated rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, 95,* 426-435.

NEUBERT D., OBERDISSE E. & BASS R., 1968. Biosynthesis and degradation of mammalian mitochondrial DNA. In : *Biochemical aspects of the Biogenesis of Mitochondria.* Slater E.C., Tager J.M., Papa S. & Quagliariello E., ed., Adriatica Editrice, Bari, 103-122.

NEUPERT W. & LUDWIG G.D., 1971. Sites of biosynthesis of outer and inner membrane proteins of *Neurospora crassa* mitochondria. *Eur. J. Biochem., 19,* 523-532.

PARSONS J.A., 1965. Mitochondrial incorporation of tritiated thymidine in *Tetrahymena pyriformis. J. Cell Biol., 25,* 641-646.

PARSONS J.A. & DICKSON R.C., 1965. Isolation of mitochondrial DNA from *Tetrahymena pyriformis. J. Cell Biol., 27,* 77A.

PARSONS J.A. & RUSTAD R.C., 1968. The distribution of DNA among dividing mitochondria of *Tetrahymena pyriformis. J. Cell Biol., 37,* 683-693.

PARSONS P. & SIMPSON M.V., 1967. Biosynthesis of DNA by isolated mitochondria : incorporation of thymidine triphosphate-2-C^{14}. *Science, 155,* 91-93.

PARSONS P. & SIMPSON M.V., 1968. Studies on DNA biosynthesis in isolated rat-liver mitochondria. In : *Biochemical aspects of the Biogenesis of Mitochondria.* Slater E.C., Tager J.M., Papa S. & Quagliariello E., ed., Adriatica Editrice, Bari, 171-187.

PICA-MATTOCCIA L. & ATTARDI G., 1972. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. IX. Replication of mitochondrial DNA in relationship to the cell cycle in HeLa cells. *J. Mol. Biol., 64,* 465-484.

PIKO L., TYLER A. & VINOGRAD J., 1967. Amount, location, priming capacity, circularity and other properties of cytoplasmic DNA in sea urchin eggs. *Biol. Bull., 132,* 68-90.

PLAUT W. & SAGAN L.A., 1958. Incorporation of thymidine in the cytoplasm of *Amoeba proteus. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4,* 843-846.

PLESNER P., RASMUSSEN L. & ZEUTHEN E., 1964. Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena.* In : *Synchrony in cell division and growth.* Zeuthen E., ed., Interscience Publ. Inc., New York, 543-563.

RABINOWITZ M., SINCLAIR J., DeSALLE L., HASELKORN R., SWIFT H.H., 1965. Isolation of deoxyribonucleic acid from mitochondria of chick embryo heart and liver. *Proc. Nat. Acad. Sci., 53,* 1126-1133.

RABINOWITZ M. & SWIFT H., 1970. Mitochondrial nucleic acids and their relation to the biogenesis of mitochondria. *Physiol. Reviews, 50,* 376-427.

RAFF R.A. & MAHLER H.R., 1972. The non symbiotic origin of mitochondria. *Science, 177,* 575-582.

REICH E. & LUCK D.J.L., 1966. Replication and inheritance of mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., 55,* 1600-1608.

REYNOLDS E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque in electron microscopy. *J. Cell Biol., 17,* 208-212.

RIS H., 1962. Ultrastructure of certain self-dependent cytoplasmic organelles. In : *5th Intern. Congress for Electron Microscopy, vol. 2,* Bresse S.S., jr., ed., Acad. Press, New York, p. XX1-XX2.

RIS H. & PLAUT W., 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas. J. Cell Biol., 13,* 383-391.

RISUENO M.C., GIMENEZ-MARTIN G. & GONZALEZ-FERNANDEZ A., 1971. Ultrastructural analysis of cytokinesis in plant cells blocked at prophase. *J. Microscopie, 10,* 331-336.

ROODYN D.B. & WILKIE D., 1968. Mitochondrial protein synthesis. In : *The biogenesis of mitochondria.* Methuen & Co. Ltd, Londres, 31-52.

SAGER R. & ISHIDA M.R., 1963. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas. Proc. Nat. Acad. Sci., 50,* 725-730.

SCHAECHTER M., BENTZON M.W. & MAALOE O., 1959. Synthesis of DNA during the cell cycle of Bacteria. *Nature, 183,* 1207-1208.

SCHATZ G., 1970. Biogenesis of mitochondria. In : *Membranes of mitochondria and chloroplasts.* Racker E., ed., Van Nostrand Reinhold Co., New York, 251-314.

SCHATZ G., GROOT G.S.P., MASON T., ROUSLIN W., WHARTON D.C. & SALTZGABER J., 1972. Biogenesis of mitochondrial inner membranes in bakers' yeast. *Fed. Proc., 31,* 21-29.

SCHATZ G., HASLBRUNNER E. & TUPPY H., 1964a. Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 15,* 127-132.

SCHATZ G., HASLBRUNNER E. & TUPPY H., 1964b. Intramitochondriale Deoxyribonukleinsaüre in Saügetierzellen. *Monatsh. Chem., 95,* 1135-1145.

SCHERBAUM O.H., 1960. Possible sites of metabolic control during the induction of synchronous cell division. *Ann. Acad. Sci. N.Y., 90,* 565-579.

SCHNEIDER W.C. & GRECO A.E., 1971. Incorporation of pyrimidine deoxyribonucleosides into liver lipids and others components. *Biochim. Biophys. Acta, 228,* 610-626.

SCHNEIDER W.C. & KUFF E.L., 1965. The isolation and some properties of rat liver mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., 54,* 1650-1658.

SCHWAB-STEY H., SCHWAB D. & KREBS W., 1971. Electron microscopic examination of isolated mitochondria of *Tetrahymena pyriformis. J. Ultrastructure Res., 37,* 82-93.

SINCLAIR J.H., 1966. Mitochondrial DNA and other low molecular weight cellular DNA's. In : *Ph.D. Thesis University of Chicago,* Chicago, Illinois.

SINCLAIR J.H. & STEVENS B.J., 1966. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci., 56,* 508-514.

SMITH D., TAURO P., SCHWEIZER E. & HALVORSON H.O., 1968. The replication of mitochondrial DNA during the cell cycle in *Saccharomyces lactis. Proc. Nat. Acad. Sci., 60,* 936-942.

STEINERT G., FIRKET H. & STEINERT M., 1958. Synthèse d'acide désoxyribonucléique dans le corps parabasal de *Trypanosoma mega. Exp. Cell Res., 15,* 632-635.

STEINERT M., 1960. Mitochondria associated with the kinetonucleus of *Trypanosoma mega*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, *8*, 542-546.

STEINERT M. & STEINERT G., 1962. La synthèse de l'ADN au cours du cycle de division de *Trypanosoma mega*. *J. Protozool.*, *9*, 203-211.

STELLY N. & ANDRE J., 1972. Mitochondries à crêtes spécialisées : répartition différentielle des mitoribosomes. *J. Microscopie*, *14*, 93a-94a.

STOCKEM W., 1968. Über den DNA- und RNS-Gehalt der Mitochondrien von *Physarum polycephalum*. *Histochemie*, *15*, 160-183.

STONE G.E. & MILLER O.L., jr., 1965. A stable mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Exp. Zool.*, *159*, 33-38.

SUYAMA Y., 1966. Mitochondrial deoxyribonucleic acid of *Tetrahymena*. Its partial physical characterization. *Biochem.*, *5*, 2214-2221.

SUYAMA Y., 1967. The origin of mitochondrial ribonucleic acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem.*, *6*, 2829-2839.

SUYAMA Y., 1969. DNA, RNA and ribosomes in *Tetrahymena* mitochondria. In : *Atti del Seminario di Studi Biologici*, *4*, E. Quagliariello, ed., Adriatica Editrice, Bari, 83-141.

SUYAMA Y. & BONNER W.D., 1966. DNA from plant mitochondria. *Plant Physiol.*, *41*, 383-388.

SUYAMA Y. & EYER J., 1968. RNA synthesis in isolated mitochondria from *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.*, *243*, 320-328.

SUYAMA Y. & MIURA K., 1968. Size and structural variations of mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, *60*, 235-242.

SUYAMA Y. & PREER J.R., jr., 1965. Mitochondrial DNA from protozoa. *Genetics*, *52*, 1051-1058.

SWIFT H., 1965. Nucleic acids of mitochondria and chloroplasts. *Am. Naturalist*, *99*, 201-227.

SWIFT H., ADANS B.J. & LARSEN K., 1964. Electron microscope cytochemistry of nucleic acids in *Drosophila* salivary glands and *Tetrahymena*. *J. Roy. Micr. Soc., 83,* 161-167.

SWIFT H. & WOLSTENHOLME D.R., 1969. Mitochondria and Chloroplasts : nucleic acids and the problem of biogenesis. In : *Handbook of Molecular Cytology,* A. Lima-de-Faria, ed., North Holland Pub. Co., Amsterdam, 972-1046.

THIERY J.P., 1967. Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie, 6,* 987-1018.

TURNER G. & LLOYD D., 1971. The effect of chloramphenicol on growth and mitochondrial function of the ciliate protozoon *Tetrahymena pyriformis* strain ST. *J. Gen. Microbiol., 67,* 175-188.

TZAGOLOFF A. & MEAGHER P., 1972. Assembly of the mitochondrial membrane system. VI. Mitochondrial synthesis of subunit proteins of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase. *J. Biol., Chem., 247,* 594-603.

VAN BRUGGEN E.F.J., BORST P., RUTTENBERG G.J.C.M., GRUBER M. & KROON A.M., 1966. Circular mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta, 119,* 437-439.

VAN BRUGGEN E.F.J., RUNNER C.M., BORST P., RUTTENBERG G.J.C.M., KROON A.M. & SCHUURMANS STEKHOVEN F.M.A.H., 1968. Mitochondrial DNA. III. Electron microscopy of DNA released from mitochondria by osmotic shock. *Biochim. Biophys. Acta, 161,* 402-414.

VAN TUBERGEN R.P. & SETLOW R.D., 1961. Quantitative radioautographic studies on exponentially growing cultures of *Escherichia coli*. The distribution of parental DNA, RNA, protein and cell wall among progeny cells. *Biophys. J., 1,* 589

VIGNAIS P.V., HUET J. & ANDRE J., 1969. Isolation and characterization of ribosomes from yeast mitochondria. *FEBS Letters, 3,* 177-181.

VIGNAIS P.V., STEVENS B.J., HUET J. & ANDRE J., 1972. Mitoribosomes from *Candida utilis*. Morphological, physical, and chemical characterization of the monomer form and of its subunits. *J. Cell Biol., 54,* 468-492.

WEISS H., 1972a. Products of the mitochondrial protein synthesis present as polypeptides in purified cytochrome aa_3 and cytochrome b. *8th Meeting Fed. Eur. Biochem. Soc.,* n° 656.

WEISS H., 1972b. Cytochrome b in *Neurospora crassa* mitochondria. A membrane protein containing subunits of cytoplasmic and mitochondrial origin. *Eur. J. Biochem., 30,* 469-478.

WEISS H., SEBALD W., BÜCHER T., 1971. Cycloheximide resistant incorporation of amino acids into a polypeptide of the cytochrome oxidase of *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem., 22,* 19-26.

WESTERGAARD O. & LINDBERG B., 1972. An induced mitochondrial DNA polymerase from *Tetrahymena*. *Eur. J. Biochem., 28,* 422-431.

WESTERGAARD O., MARCKER K.A. & KEIDING J., 1970. Induction of a mitochondrial DNA polymerase in *Tetrahymena*. *Nature, 227,* 708-710.

WILLIAMSON D.H. & MOUSTACCHI E., 1971. The synthesis of mitochondrial DNA during the cell cycle in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 42,* 195-201.

WINTERSBERGER E., 1966. Synthesis and function of mitochondrial ribonucleic acid. In : *Regulation of metabolic processes in mitochondria*. J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & E.C. Slater, ed., Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 439-450.

WINTERSBERGER E., 1968. Synthesis of DNA in isolated yeast mitochondria. In : *Biochemical aspects of the Biogenesis of Mitochondria*. Slater E.C., Tager J.M., Papa S. & Quagliariello E., ed., Adriatica Editrice, Bari, 189-205.

WINTERSBERGER U. & WINTERSBERGER E., 1970a. Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. 1. Partial purification and properties of two DNA polymerases from mitochondria-free cell extracts. *Eur. J. Biochem., 13,* 11-19.

WINTERSBERGER U. & WINTERSBERGER E., 1970b. Studies on Deoxyribonucleic acid polymerases from Yeast. 2. Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from Wild Type and respiration-deficient Yeast cells. *Eur. J. Biochem., 13,* 20-27.

WOLSTENHOLME D.R. & GROSS N.J., 1968. The form and size of mitochondrial DNA of the red bean, *Phaseolus vulgaris. Proc. Nat. Acad. Sci., 61,* 245-252.

WOOD D.D. & LUCK D.J.L., 1969. Hybridization of mitochondrial ribosomal RNA. *J. Mol. Biol., 41,* 211-224.

LEGENDES DES FIGURES

FIGURE 1. Souche 1.
Cellule d'une culture en phase exponentielle de croissance. Les mitochondries (flèches) sont disposées en majorité à la périphérie de la cellule loin du macronoyau (Mn). Le micronoyau n'est pas visible sur cette coupe. V : vacuoles. X 5800.

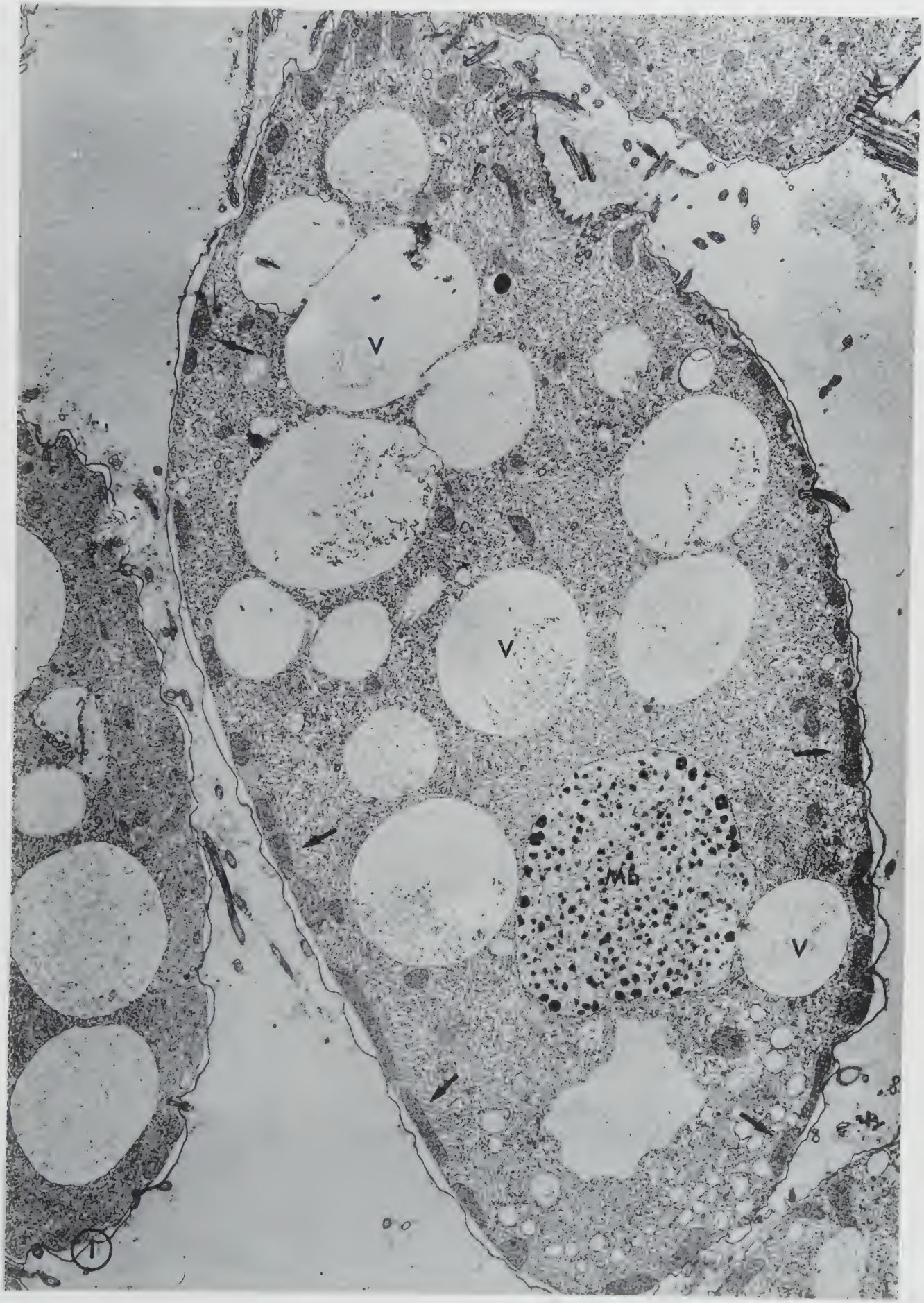

V
V
Mb
V

FIGURE 2. Souche ST.
Mitochondrie d'une cellule d'une culture en phase exponentielle. De nombreuses crêtes tubulaires encombrent la matrice mitochondriale. Les ribosomes mitochondriaux sont visibles (flèches). X 130 000.

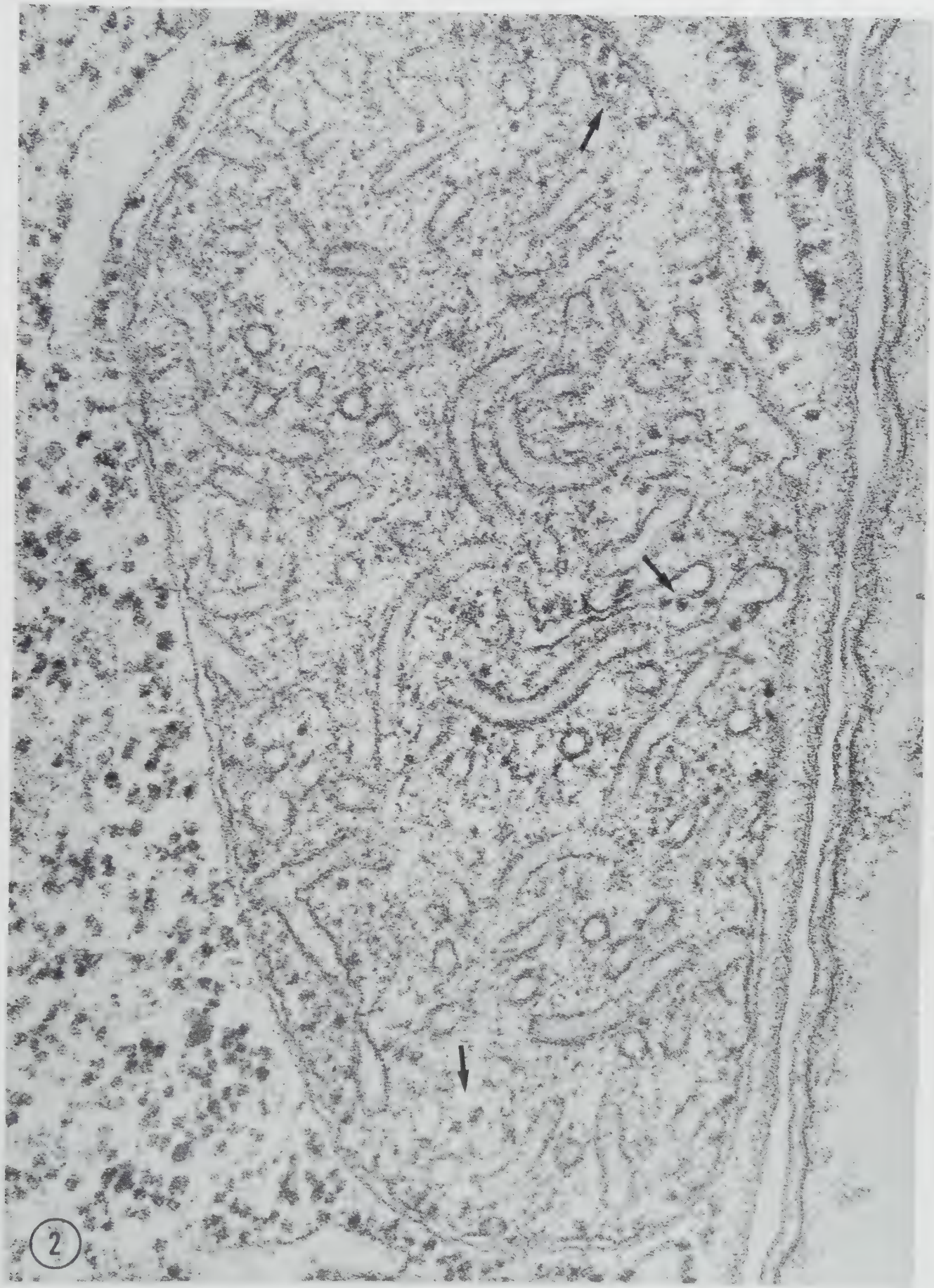
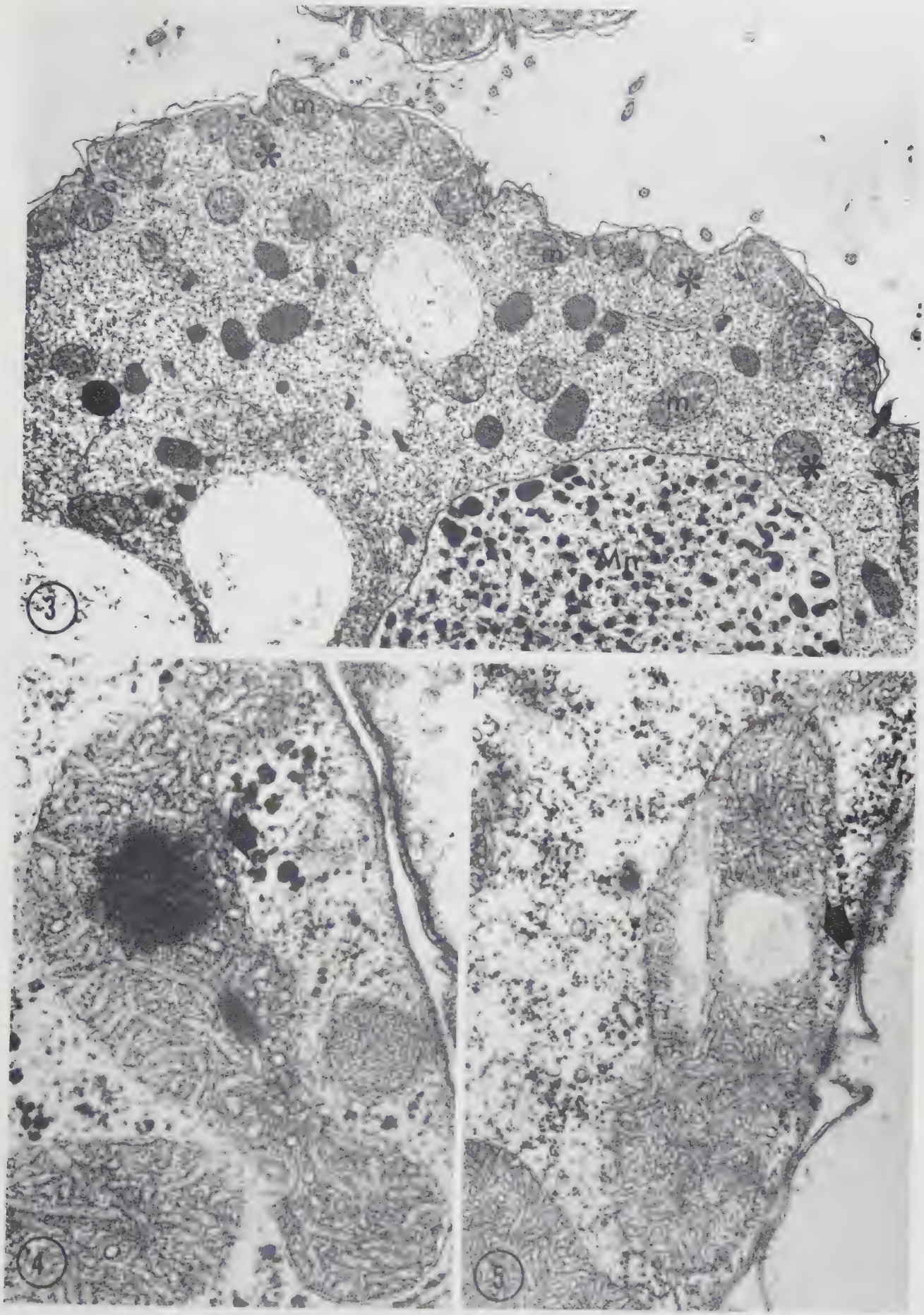

2

FIGURE 3. Souche ST
Portion de cytoplasme d'une cellule de culture en phase exponentielle. La majeure partie des mitochondries (m) est située à la périphérie de la cellule. Dans certaines d'entre elles, on constate la présence de petites inclusions (*) qui, peu développées en phase exponentielle, le sont beaucoup plus en phase stationnaire (voir la figure suivante). Mn : macronoyau, X 13 800.

FIGURE 4. Souche ST
Mitochondrie d'une cellule en phase stationnaire. Cette mitochondrie possède une inclusion (flèche) de volume important. X 60 000.

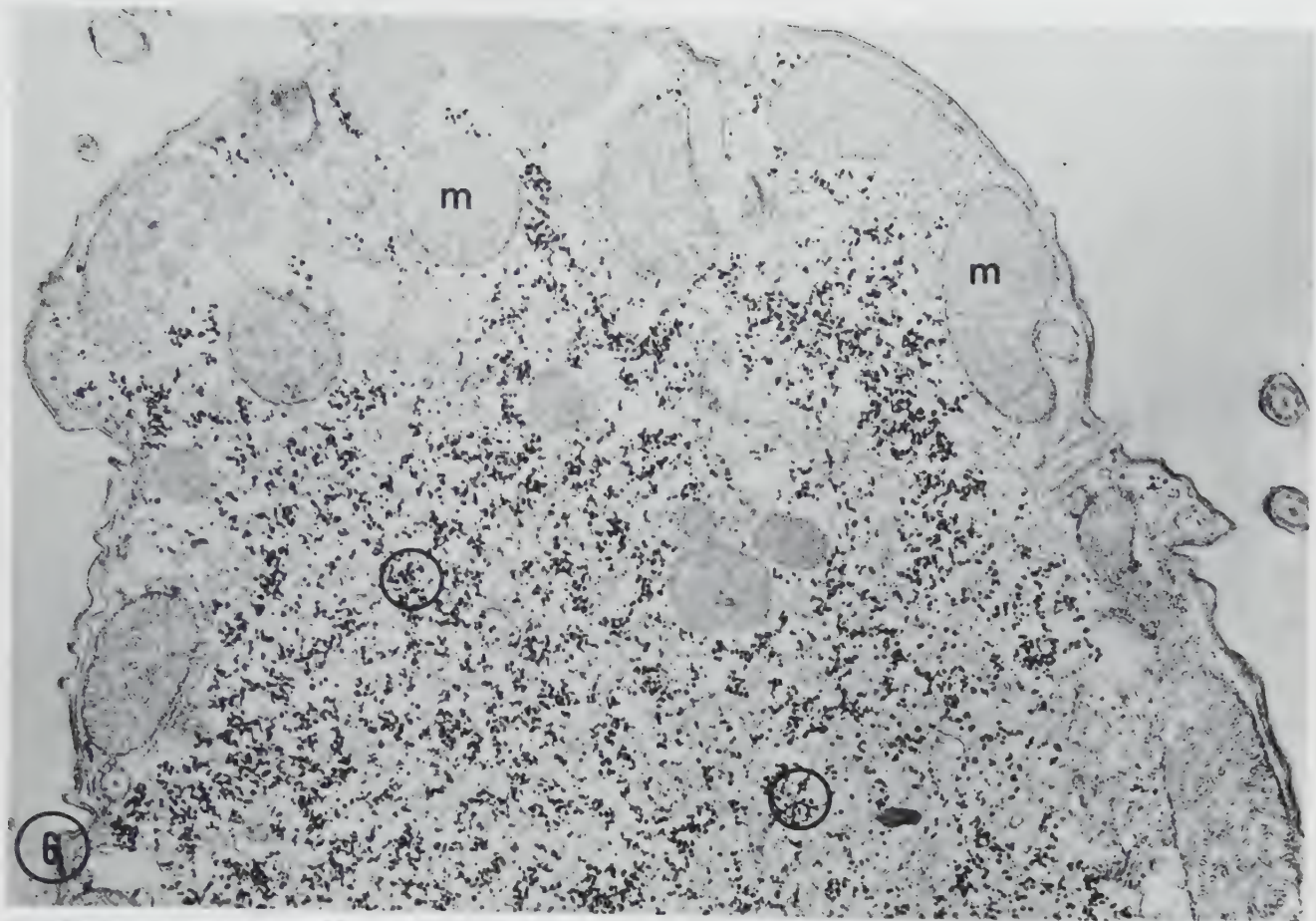
FIGURE 5. Souche ST
Traitement à la pronase sur coupe de cellule en phase stationnaire, incluse en Epon. L'inclusion dans la mitochondrie a disparu après action de la pronase. X 32 000.


m
m
m
Мт
3
4
5

FIGURES 6 et 7. Mise en évidence du glycogène selon la technique décrite par Thiéry.

Dans la souche 1, figure 6, de nombreuses particules de glycogène sont groupées en amas dans le cytoplasme, alors que dans la souche ST, figure 7, elles sont moins nombreuses, de plus grande taille et plus éparses dans le cytoplasme. La taille des particules de glycogène est plus faible dans la souche 1 que dans la souche ST. Phase exponentielle de croissance.

Figure 6 : X 18 000 ; Figure 7 : X 15 000


m
m
6

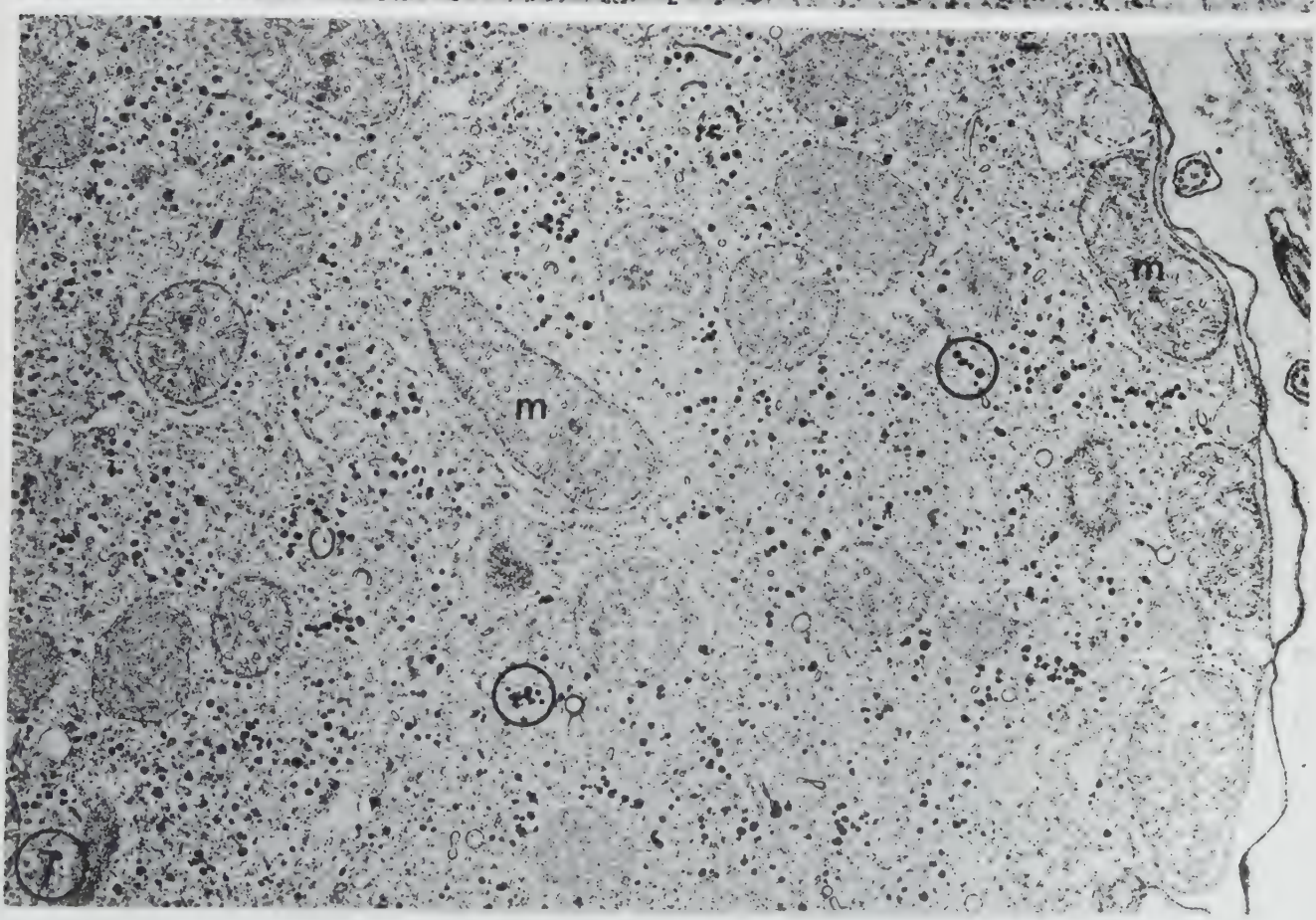
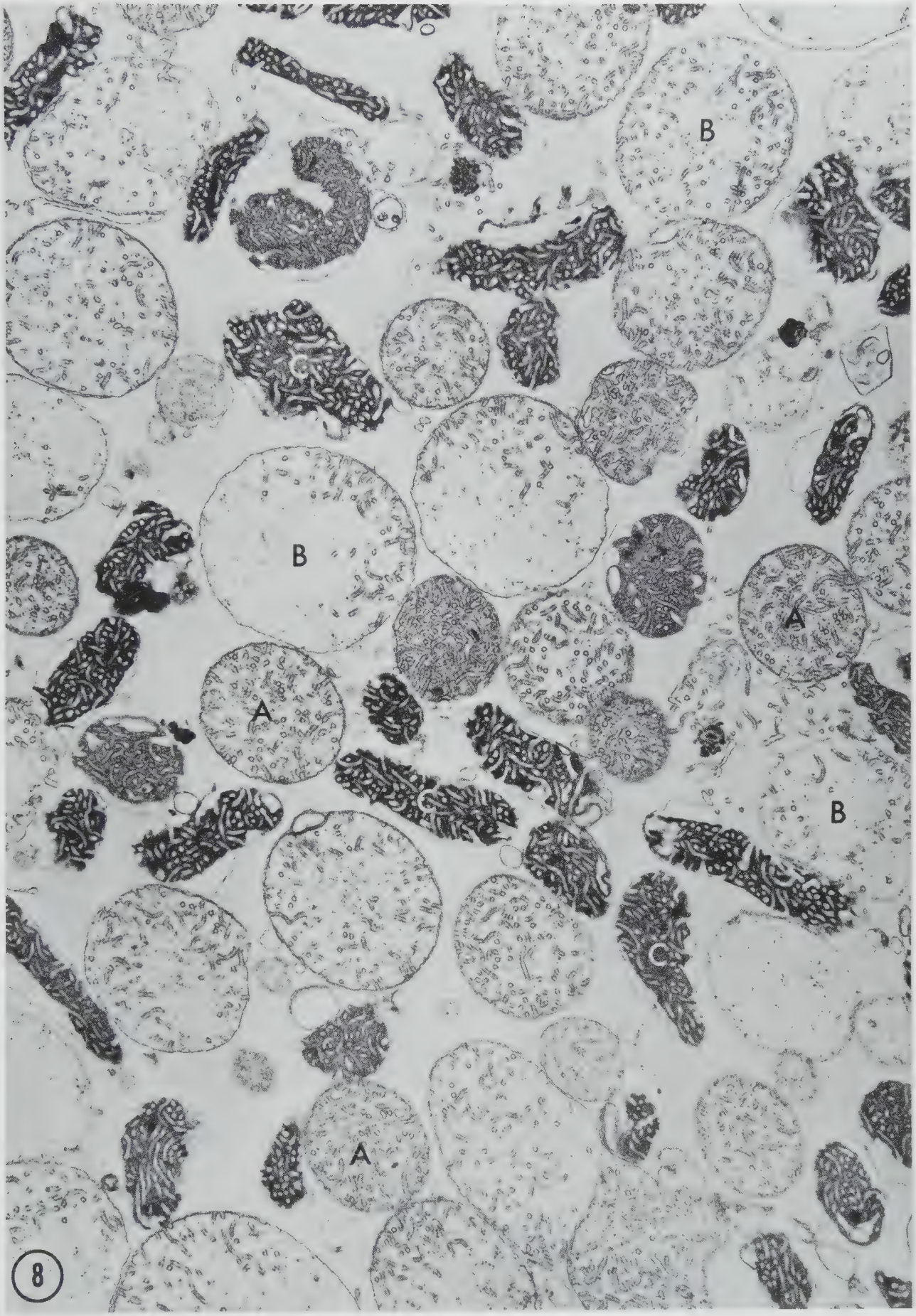

m
m
7

FIGURE 8. Culot de mitochondries isolées de la souche ST. Fixation glutaraldéhyde-acide osmique.

On peut voir les trois aspects présentés par les mitochondries ; certaines à membrane externe déchirée, sont gonflées (B) avec peu de crêtes et une matrice claire, d'autres à espace intermembranaire dilaté, sont contractées (C) avec des crêtes serrées et une matrice dense aux électrons, d'autres enfin présentent un aspect intermédiaire (A). X 20 400.


B
C
B
A
A
B
B
C
A
8

FIGURES 9 à 12 - Mise en évidence de l'ADN dans les mitochondries.

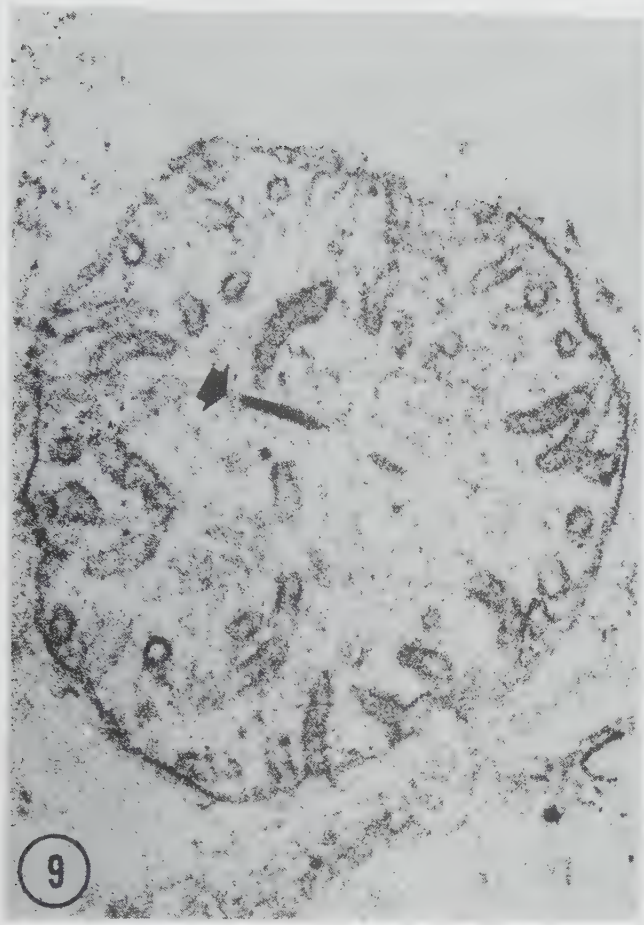
FIGURES 9, 10 et 11 - Mitochondries de cellules entières. L'ADN se présente en amas de fibrilles condensées d'où partent quelquefois de fins filaments (flèches) visibles sur les figures 10 et 11.

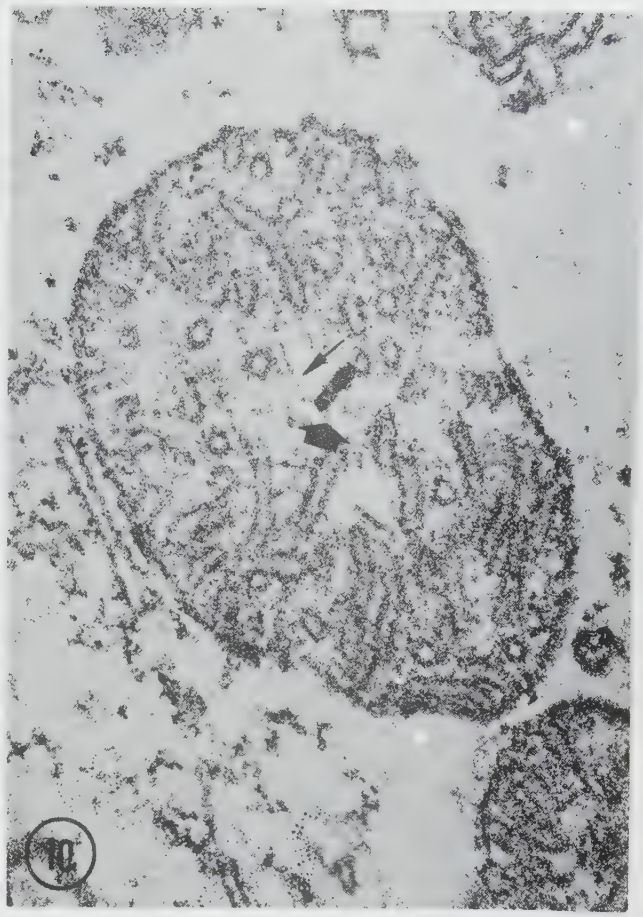
Fig. 9 - Souche 1, fixation OsO_4. X 75 000.

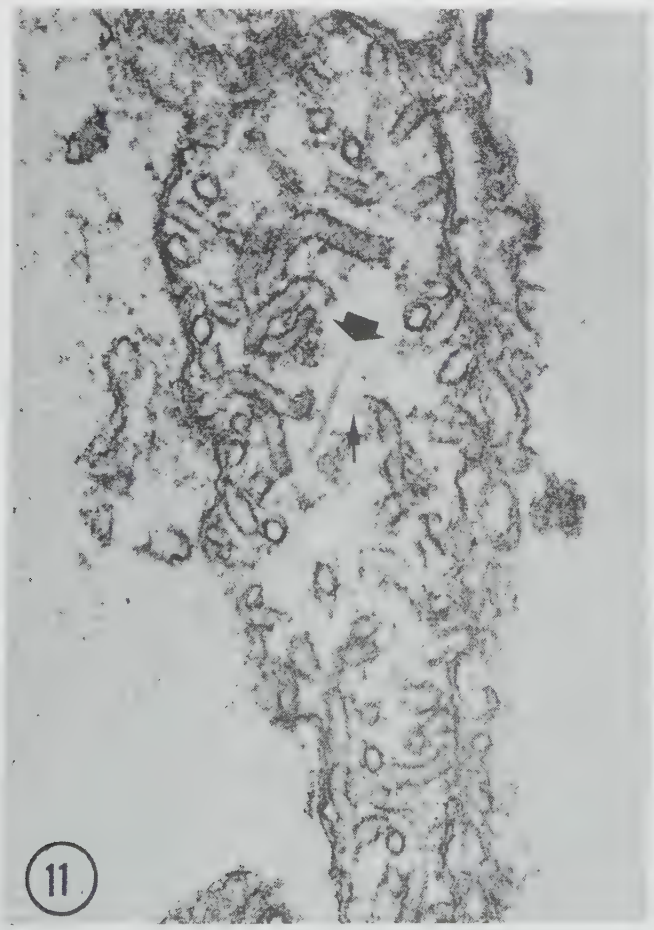
Fig. 10 - Souche ST, fixation $K_2Cr_2O_7$-OsO_4. X 75 000.

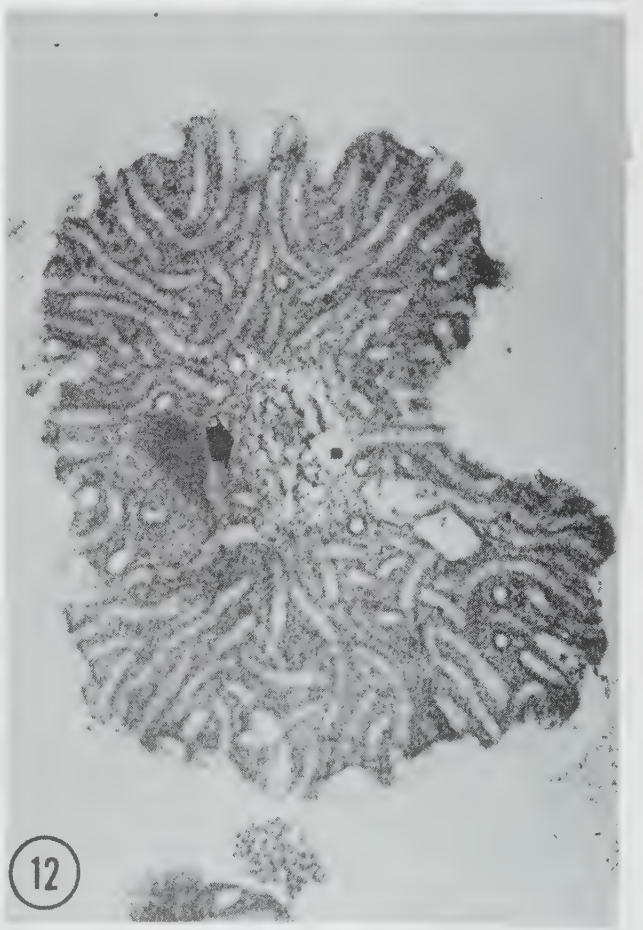
Fig. 11 - Souche 1, même fixation que le figure 10. X 70 000.

FIGURE 12 - Mitochondrie isolée, souche ST, fixation OsO_4. Les amas de fibrilles condensées forment un réseau analogue au nucléoïde bactérien (flèche). X 50 000.


9


10


11

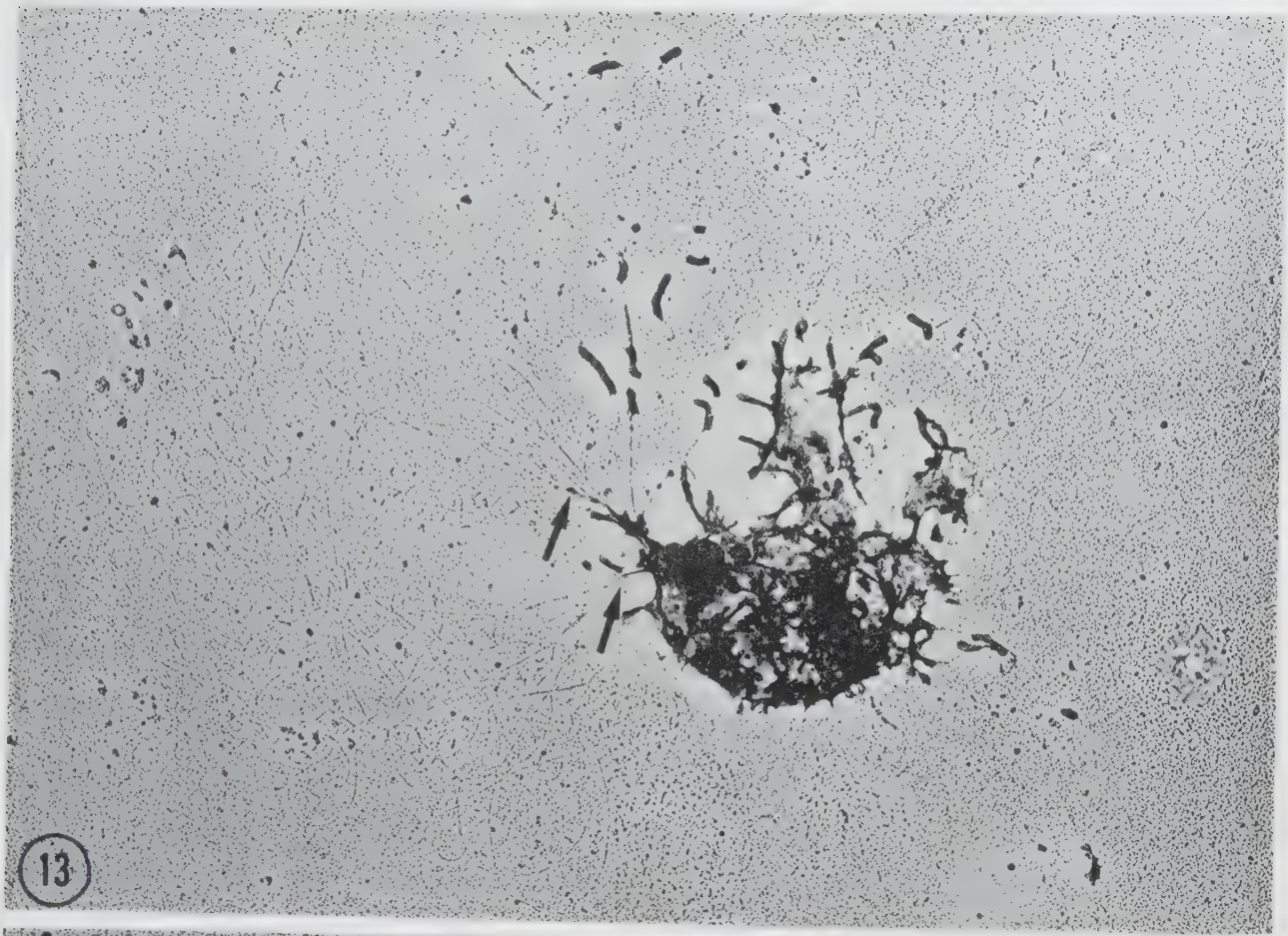

12

FIGURES 13 et 14 - Souche ST. Phase stationnaire. Mitochondries éclatées par choc osmotique.

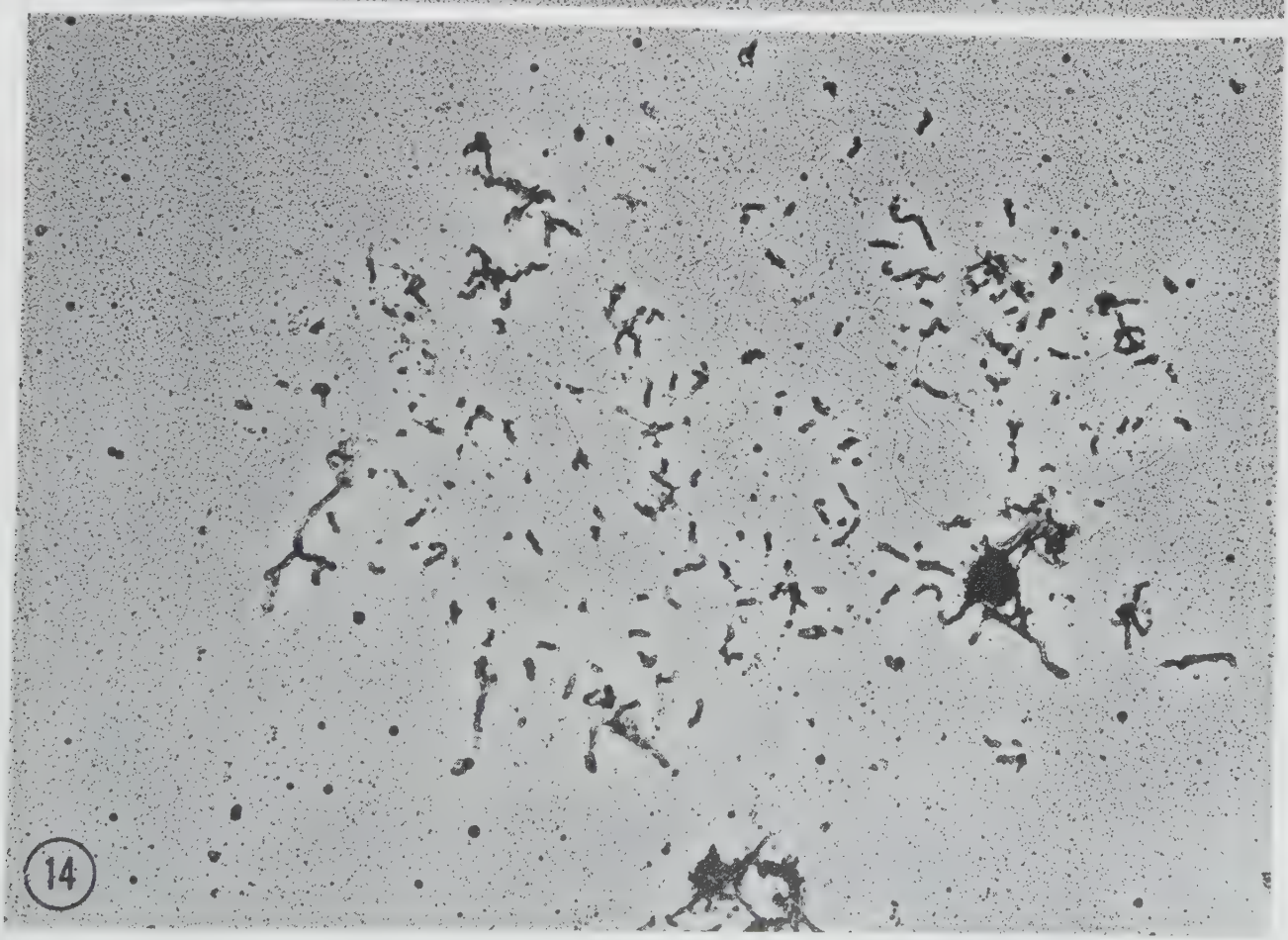
Une goutte de suspension mitochondriale est diluée 10 fois dans l'acétate d'ammonium 4 M, (figure 13) et 8 M, (figure 14). L'étalement a lieu sans attendre sur de l'eau à 4°C, après une dilution avec du cytochrome c à 0,02 % dans l'eau (V/V). Ombrage rotatif à l'oxyde d'uranium.

Fig. 13 - L'ADN reste groupé autour des membranes mitochondriales. La totalité de l'ADN mesure environ 100 µ. Certaines molécules semblent attachées aux fragments de crêtes (flèches). X 22 500.

Fig. 14 - L'ADN est très dispersé avec les fragments de crêtes et de membranes mitochondriales. X 18 000.



13



14

FIGURES 15 et 16 - Souche ST. Phase exponentielle de croissance.

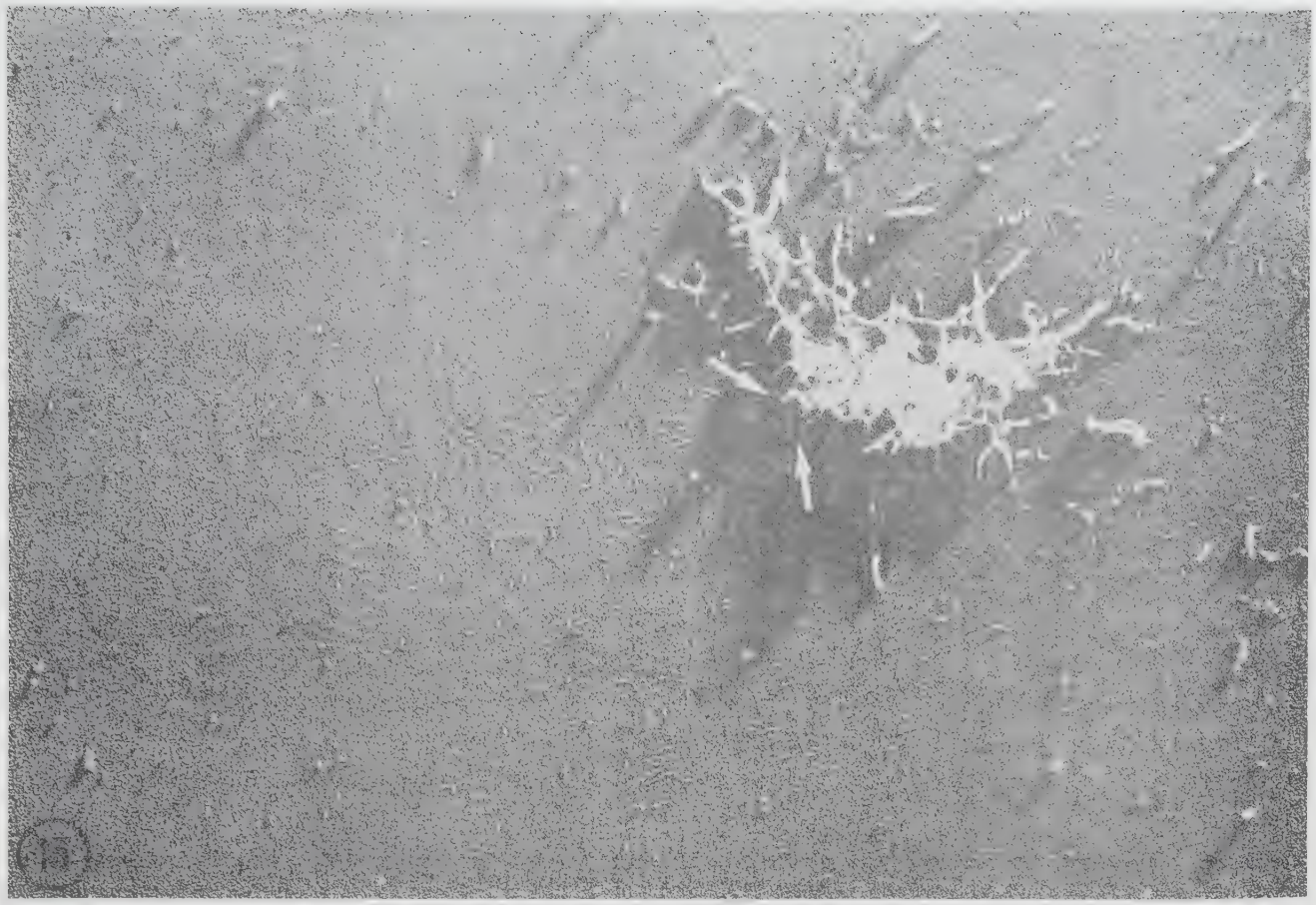
Mitochondries éclatées par choc osmotique.

Une goutte de suspension mitochondriale est diluée 10 fois dans de l'acétate d'ammonium 8 M. Cette solution attend 15 minutes sur la glace, figure 15, avant la redilution avec le cytochrome c à 0,02 % dans l'eau (V/V), ou est utilisée sans attendre, figure 16. L'étalement est effectué sur de l'eau à 4°C. Ombrage bidirectionnel au platine. X 24 000.

Les résultats sont identiques à ceux observés sur les figures 13 et 14.

Sur la figure 15, comme sur la figure 13, certaines molécules semblent attachées aux membranes mitochondriales (flèches). Longueur totale d'ADN : 98 µ.

Sur la figure 16, l'enchevêtrement des molécules est moindre, mais leur origine difficile à déceler.



FIGURES 17, 18 et 19 - Souche ST. Phase stationnaire. ADN mitochondrial obtenu à partir de mitochondries éclatées par choc osmotique.

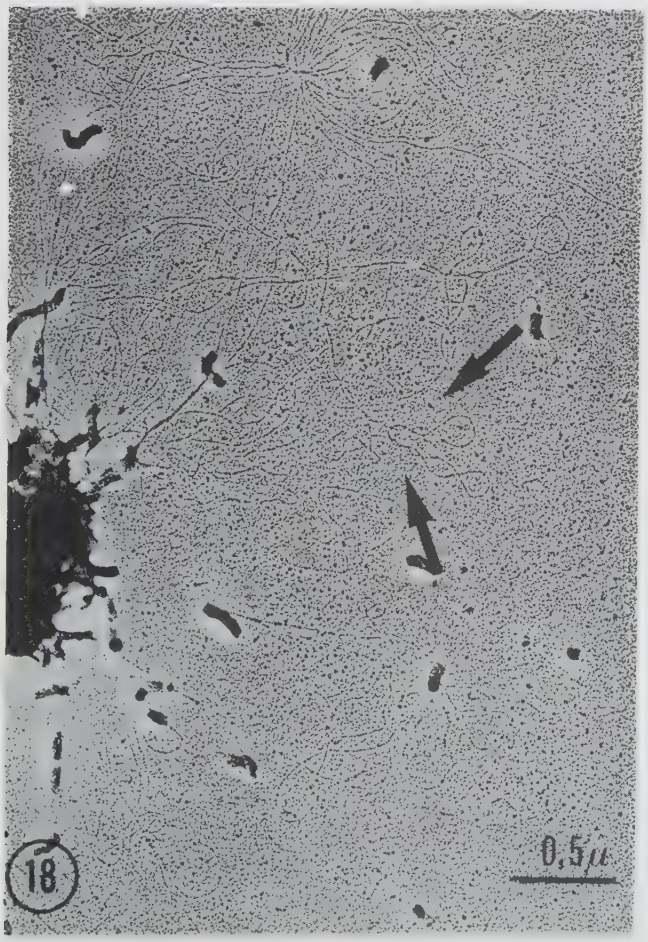
Une goutte de suspension mitochondriale est diluée 10 fois dans de l'acétate d'ammonium 4 M. La suspension est laissée en attente au moins 45 minutes sur la glace. Elle est diluée 1 fois avec du cytochrome c à 0,02 % dans l'eau et étalée sur de l'eau à 4°C. Ombrage rotatif à l'oxyde d'uranium. Figure 17 : X 45 000, Figures 18 et 19 : X 30 000.

La *figure 17* montre une molécule linéaire dont on distingue les deux bouts libres (flèches). Cette molécule présente des portions vrillées, elle mesure 17,7 µ.

La *figure 18* montre de l'ADN qui paraît attaché aux membranes mitochondriales. Dans l'enchevêtrement de l'ADN on distingue une portion de molécule vrillée.

Sur la *figure 19*, on voit une molécule linéaire à deux bouts libres, mesurant 15 µ (flèches 1), et une portion vrillée (flèches 2) dont il n'est pas possible de trouver l'origine.

17
0,5 μ

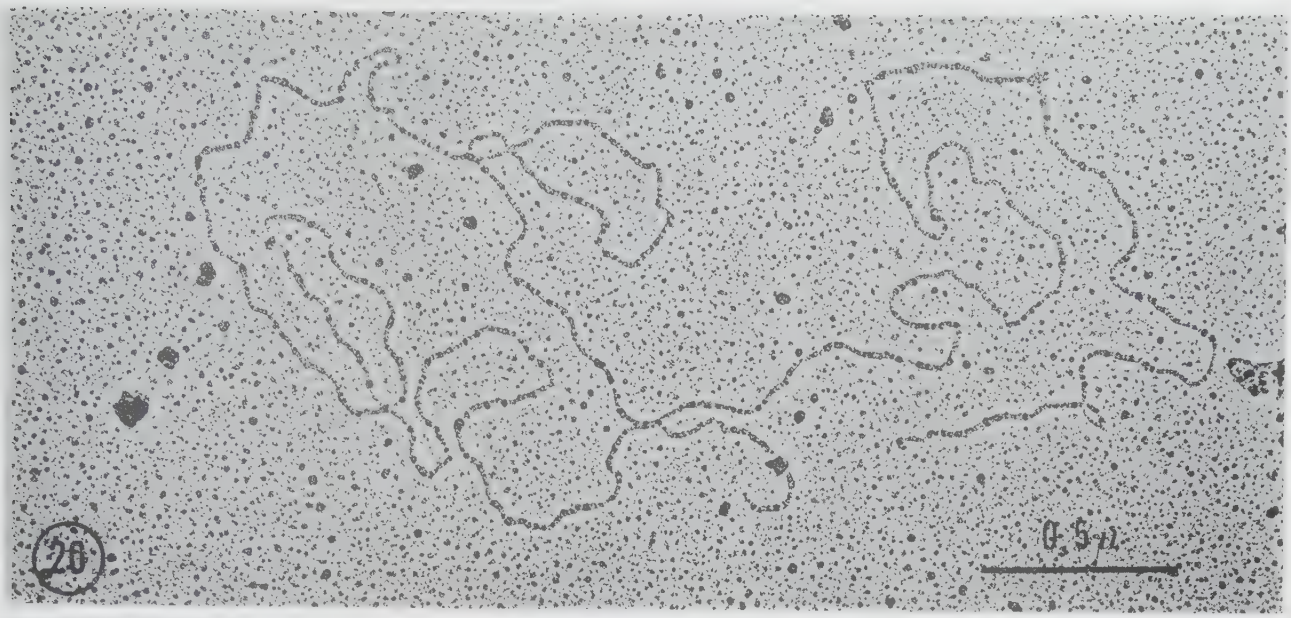

18
0,5μ

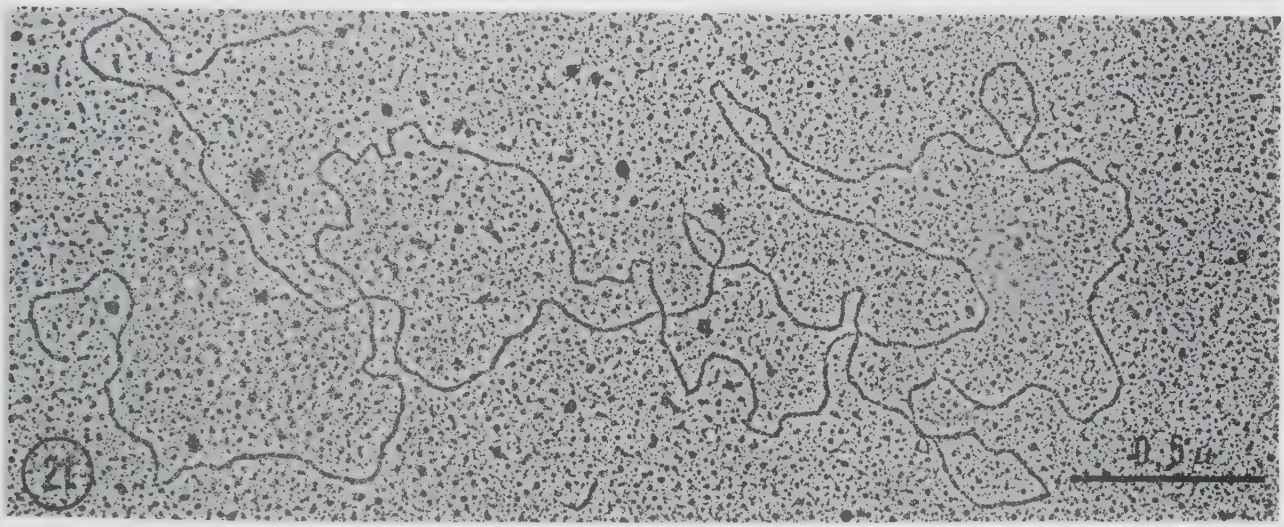
1
2
1'
19
0,5μ

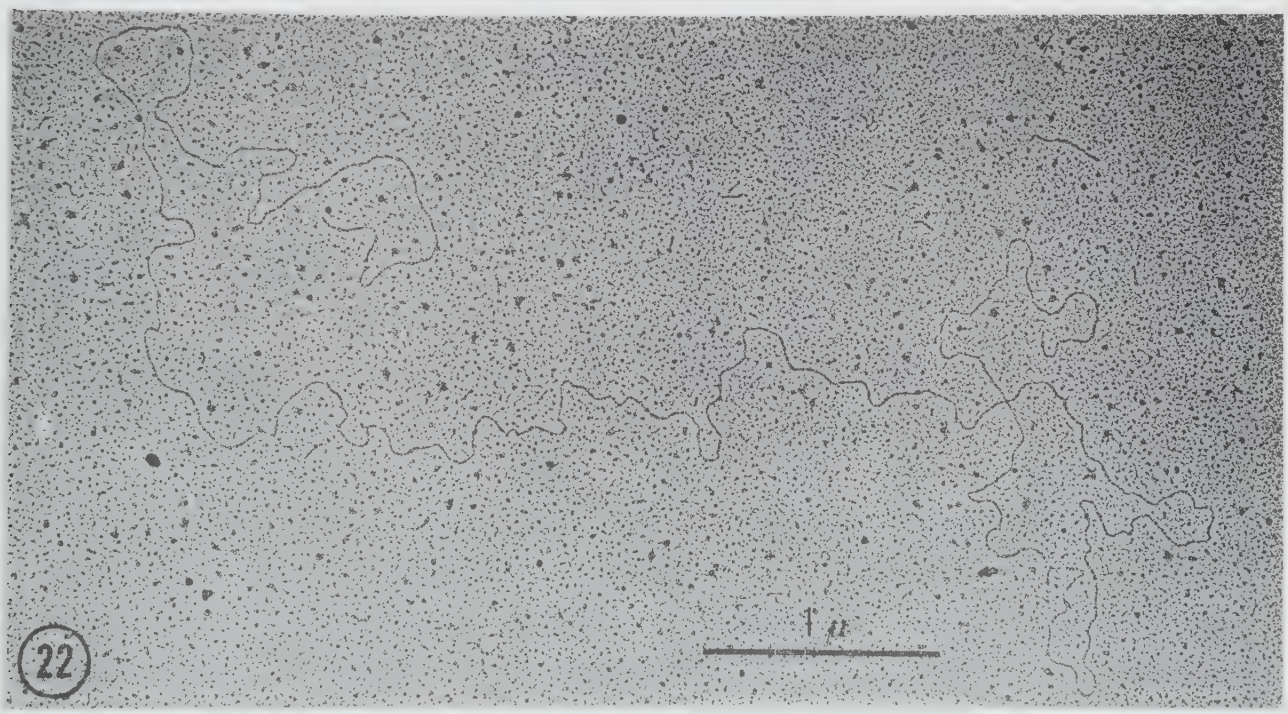
FIGURES 20, 21 et 22 - Souche ST. Phase stationnaire. ADN obtenu à partir de mitochondries lysées par le désoxycholate de sodium.

La suspension d'ADN et de mitochondries lysées est diluée 3 fois dans une solution de cytochrome c, d'acétate d'ammonium et de formol de telle sorte qu'elle soit finalement suspendue dans du cytochrome c à 0,01 %, de l'acétate d'ammonium 1 M et du formol 0,5 %. Cette préparation est étalée sur de l'acétate d'ammonium 0,3 M dans du formol à 0,5 %. Ombrage rotatif à l'oxyde d'uranium.

On obtient des molécules linéaires bien séparées, mesurant 14,6 µ (figure 20), X 50 000, 15,9 µ (Figure 21), X 50 000 et 16,7 µ (figure 22), X 31 000.


20
0,5 μ


21
0,5 μ

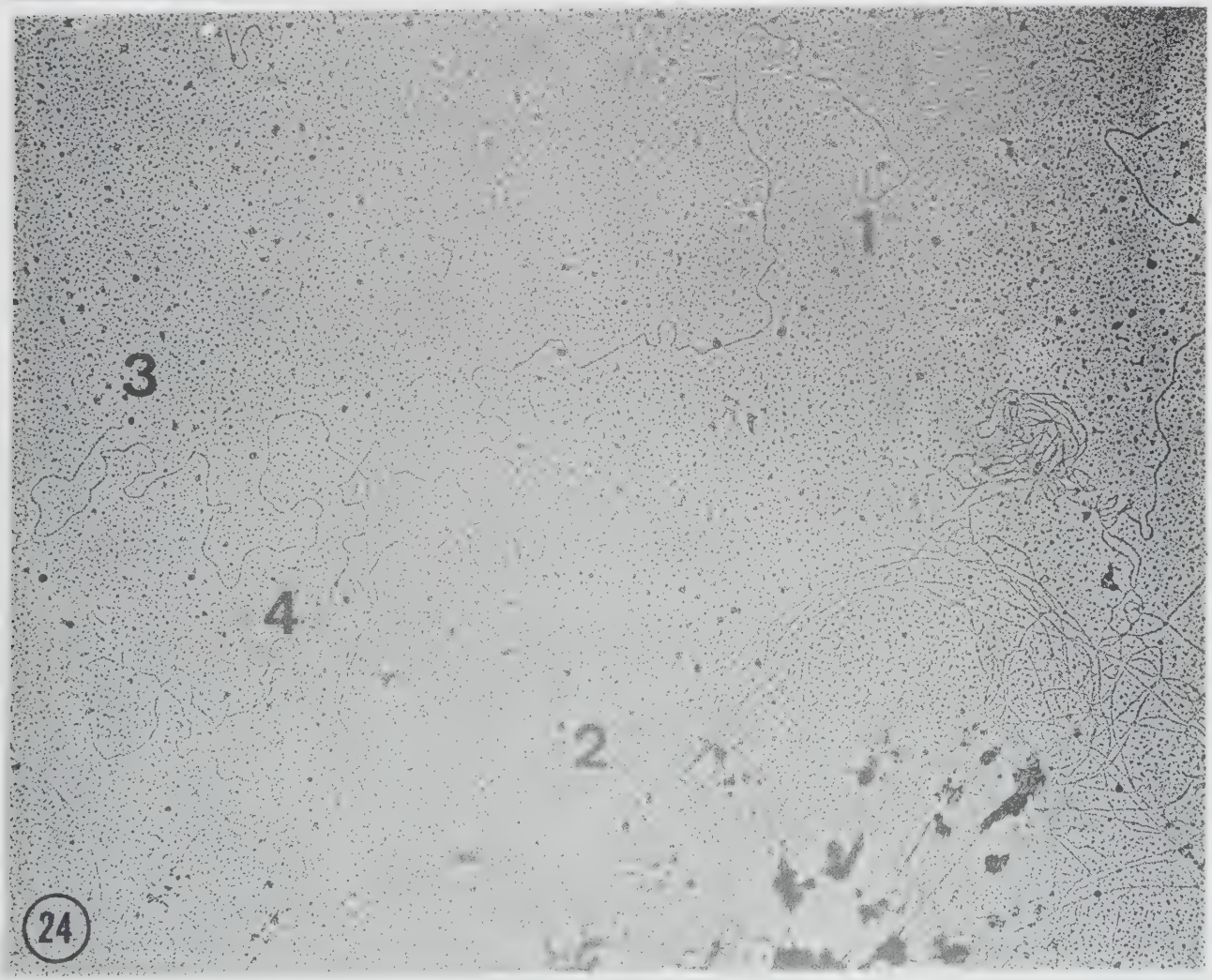

22
1 μ

FIGURES 23 et 24 - Souche ST.
ADN obtenu à partir de mitochondries lysées par le désoxycholate de sodium.
Même technique que pour les figures 20 à 22.

Figure 23 - Molécule linéaire mesurant 15,7 µ.
X 30 000.

Figure 24 - Certaines molécules ne réussissent pas à se dégager de l'enchevêtrement d'ADN et seule une de leurs extrémités est libre. Le fragment 1 mesure 8 µ, le 2, 5 µ, le 3, 8 µ et le 4, 5 µ. X 30 000.

(23)



(24)

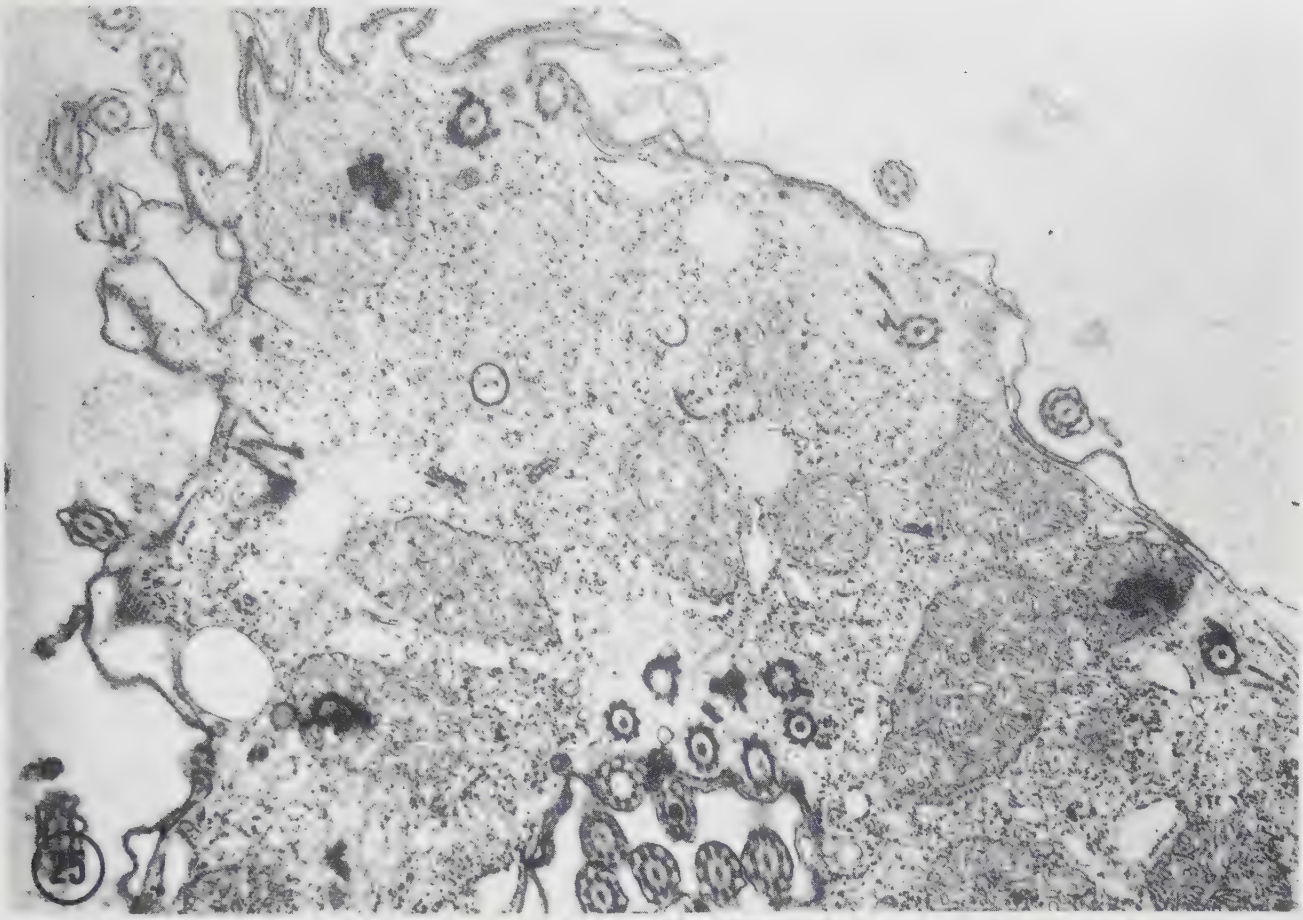
FIGURE 25. Souche 1.

Autoradiographie d'une cellule marquée 4 heures avec de la thymidine ^{3}H, d'activité spécifique 6,5 Ci/mM à la dose de 200 µCi/ml. Les grains d'argent sont situés sur les mitochondries. Exposition 5 semaines. X 22 500.

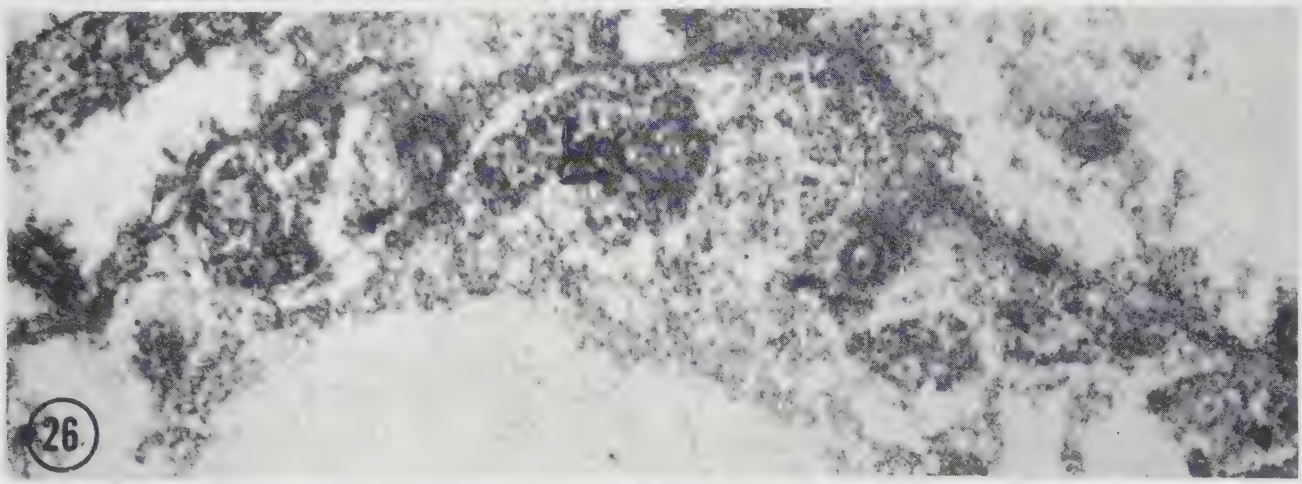
FIGURES 26 et 27. Traitement à la DNase sur des cellules entières après un marquage de 2 heures avec de la thymidine ^{3}H, d'acivité spécifique 14,2 Ci/mM à la dose de 200 µCi/ml. Elles sont fixées au formol et traitées à la DNase, à la dose de 1 mg/ml pendant 4 heures à 37°C et postfixées à l'acide osmique.

Les témoins sont des cellules traitées de la même façon mais sans DNase pendant les 4 heures à 37°C. L'autoradiographie montre un grain d'argent sur un profil mitochondrial (m) sur le témoin (figure 26), alors que dans les cellules traitées les mitochondries (m) sont dépourvues de grains d'argent (figure 27).

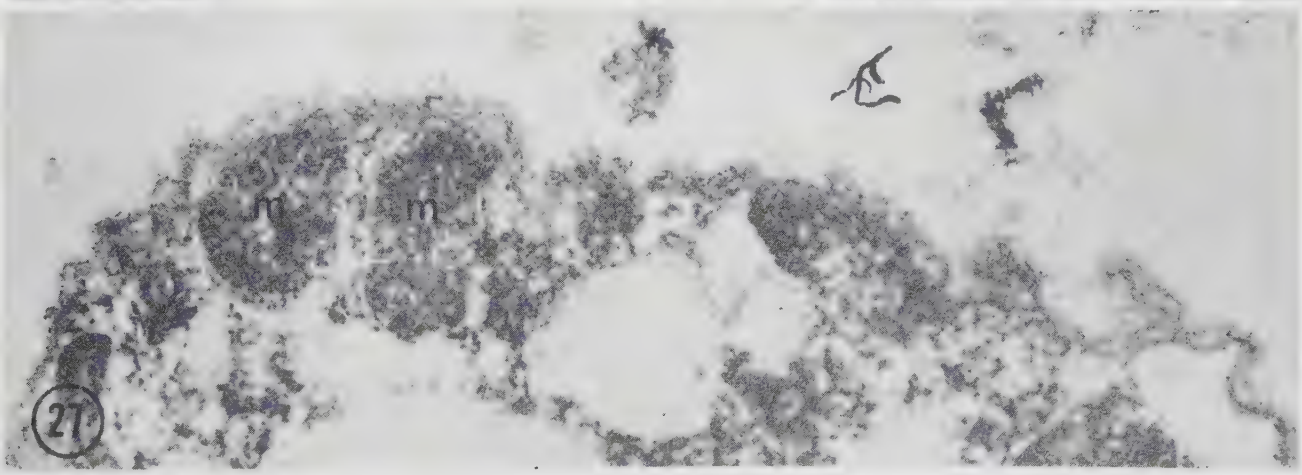
Exposition 5 semaines. Figure 26 X 28 000, Figure 27. X 25 600.



25



26



27

FIGURE 28. Souche 1.

Autoradiographie montrant une cellule après 24 heures de marquage à la thymidine ^{3}H (t_0). La presque totalité des mitochondries est marquée. Un léger marquage est localisé dans le fond cytoplasmique (flèches). V : vacuoles.

Thymidine ^{3}H d'activité spécifique 15 Ci/mM, dose de 200 µCi/ml. Exposition 5 semaines.
X 6 500.

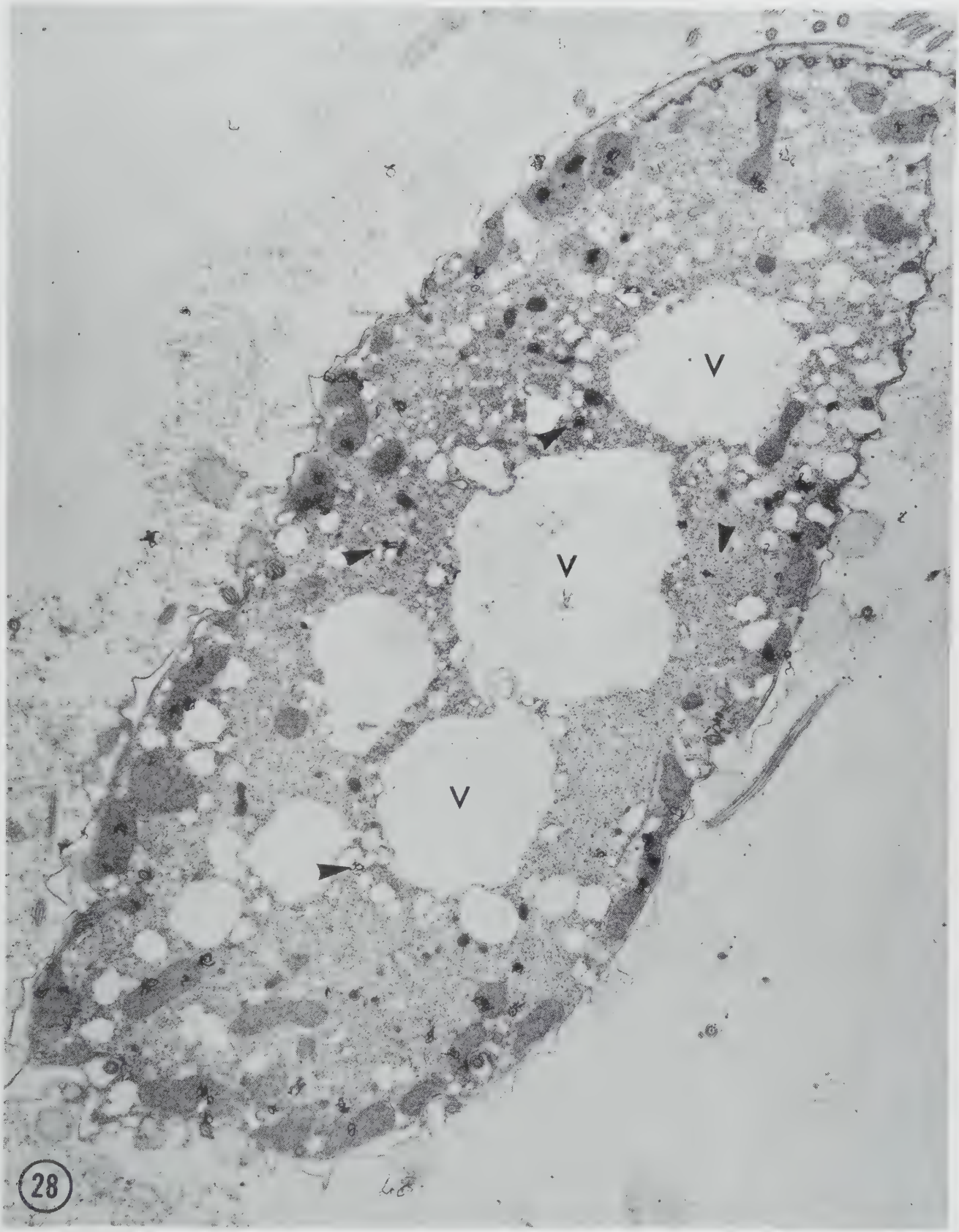
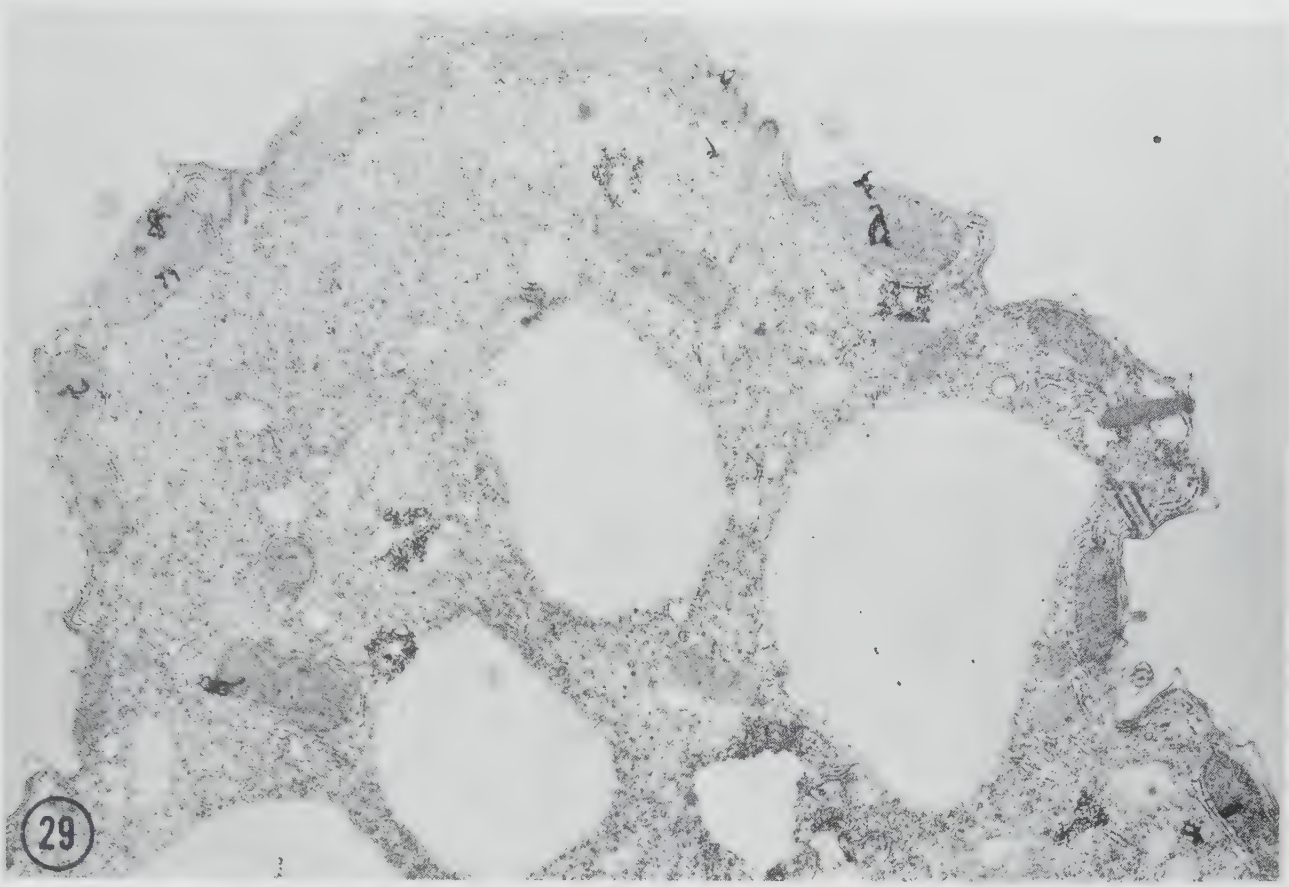
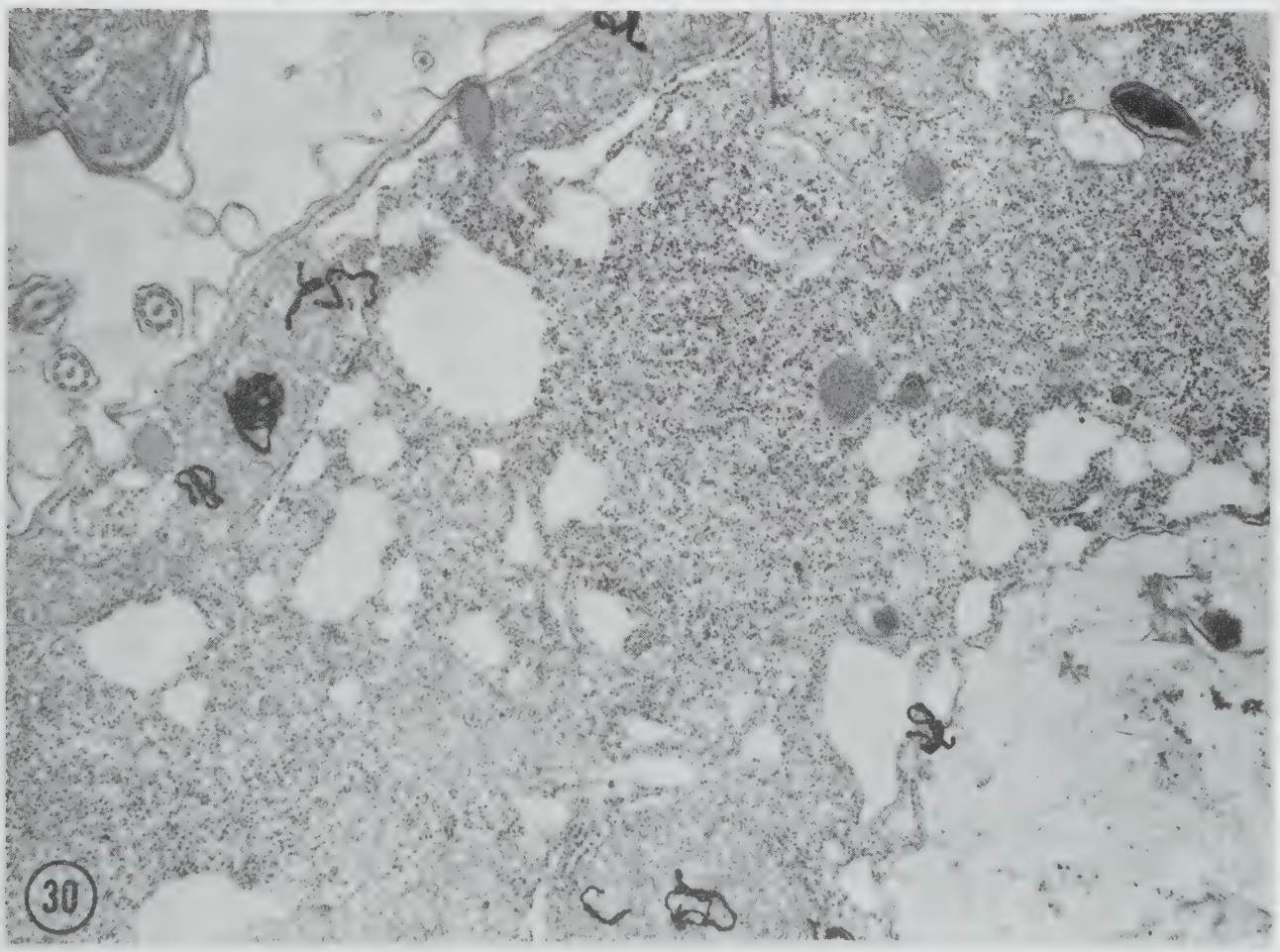

V
V
V
28

FIGURE 29 - Autoradiographie d'une cellule au temps t_2 (après 15 heures de croissance en milieu froid). Le nombre de grains d'argent dans les vacuoles et le fond cytoplasmique a considérablement diminué par rapport à la figure 28. V : vacuoles. X 11 400.

FIGURE 30 - Autoradiographie d'une cellule au temps t_1 (après 8 heures de croissance en milieu froid). Les mitochondries sont encore bien marquées. X 24 000.

FIGURES 29 et 30 - Thymidine ^3H d'activité spécifique 15 Ci/mM à la dose de 200 µCi/ml. Exposition 5 semaines.

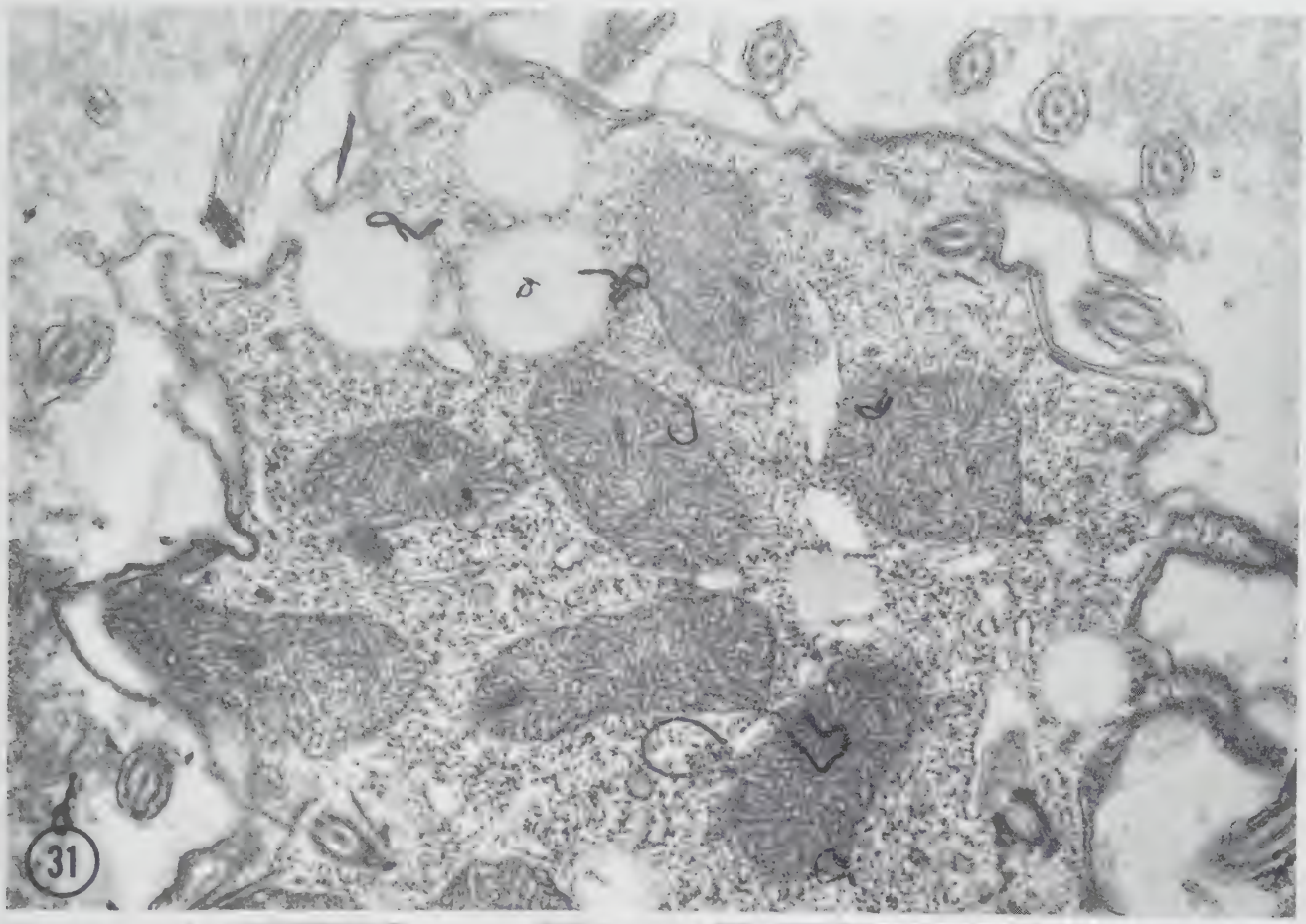

29


30

FIGURES 31 et 32- Souche 1.

Autoradiographies de cellules aux temps, t_2 (après 15 heures de croissance en milieu froid) et t_3 (après 22 heures de croissance en milieu froid). Le nombre de mitochondries radioactives diminue en fonction du temps de croissance en milieu froid.

Thymidine ^3H, d'activité spécifique 15 Ci/mM, à la dose de 200 µCi/ml. Exposition 5 semaines. X 24 000.


31

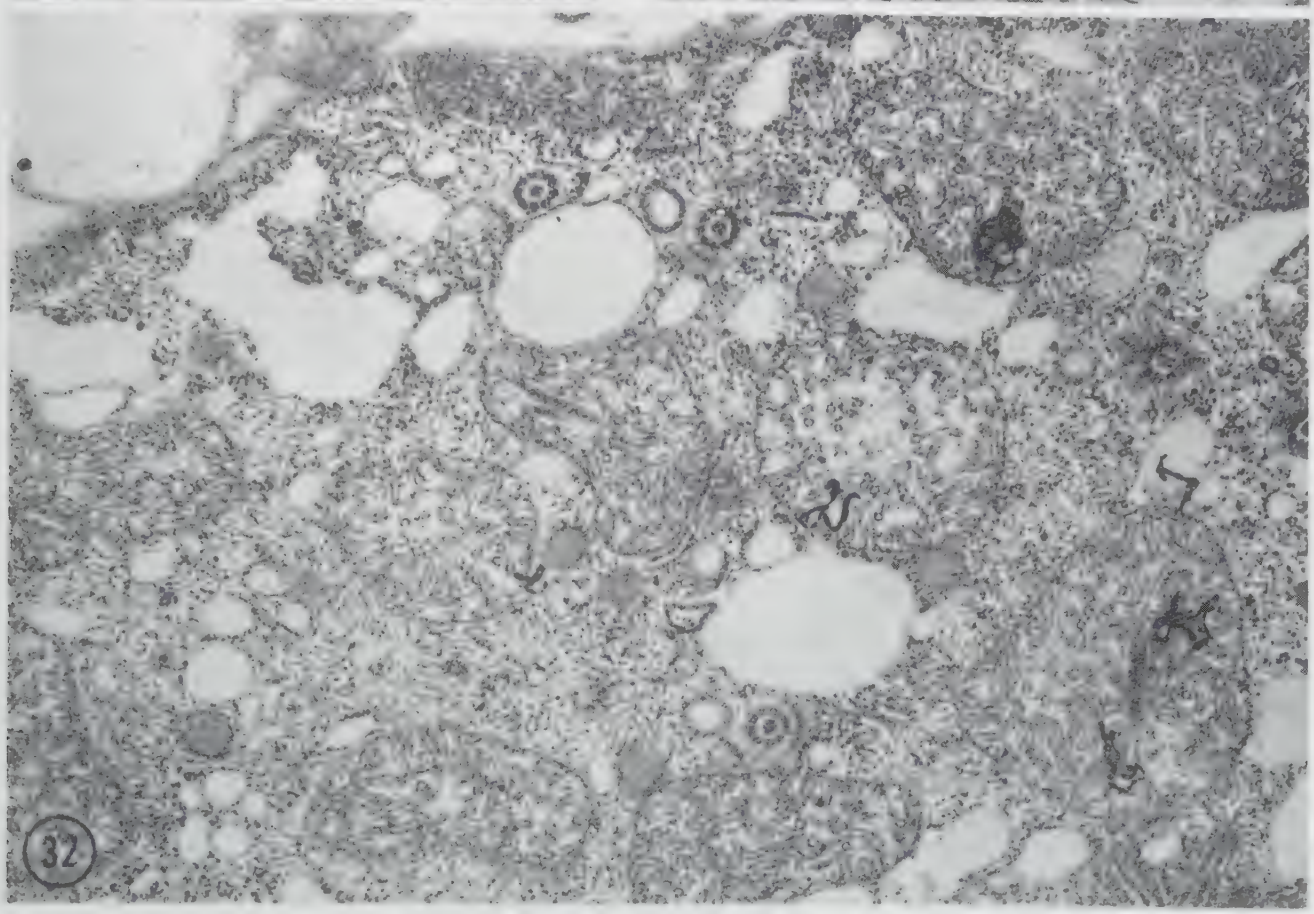
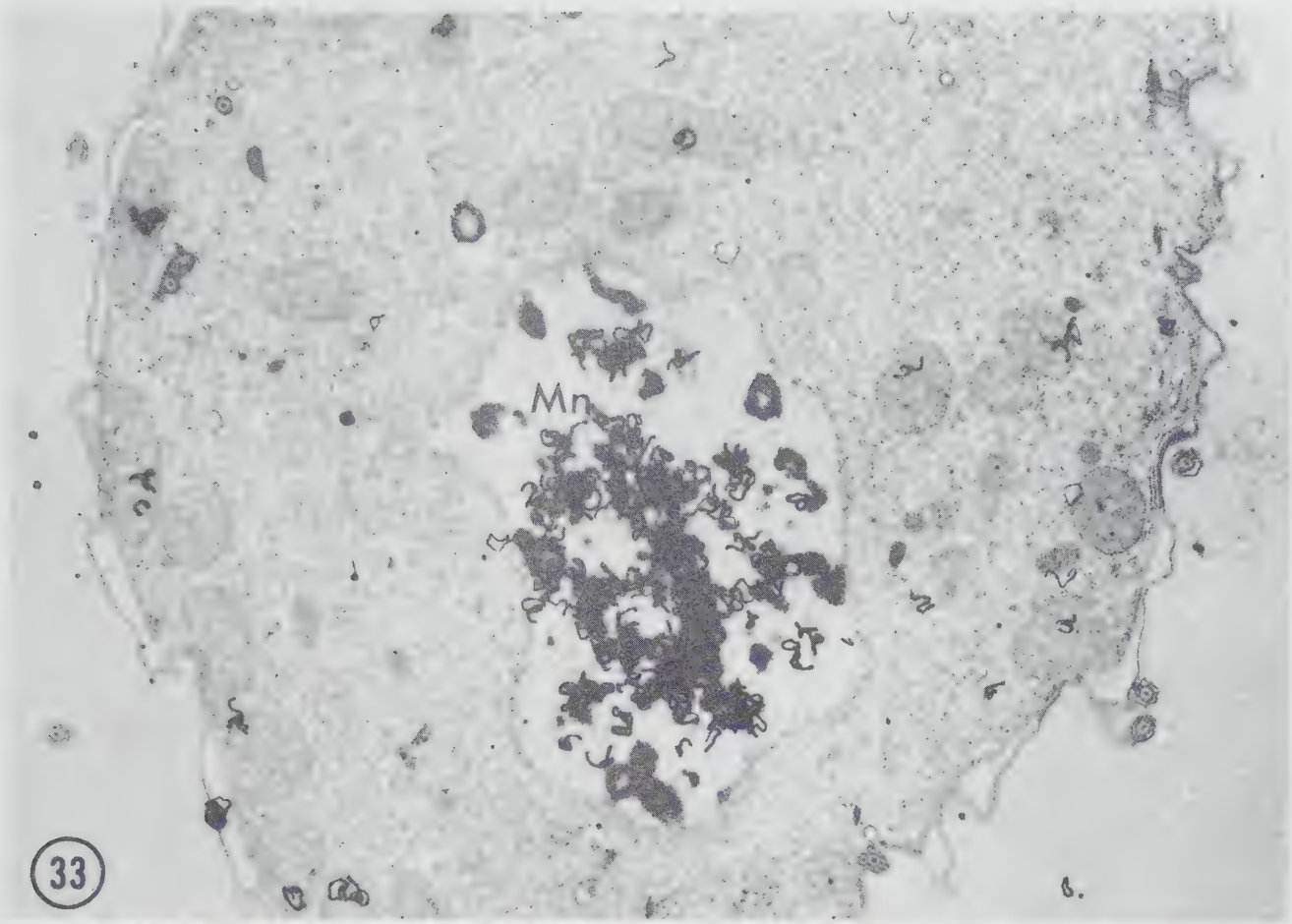

32

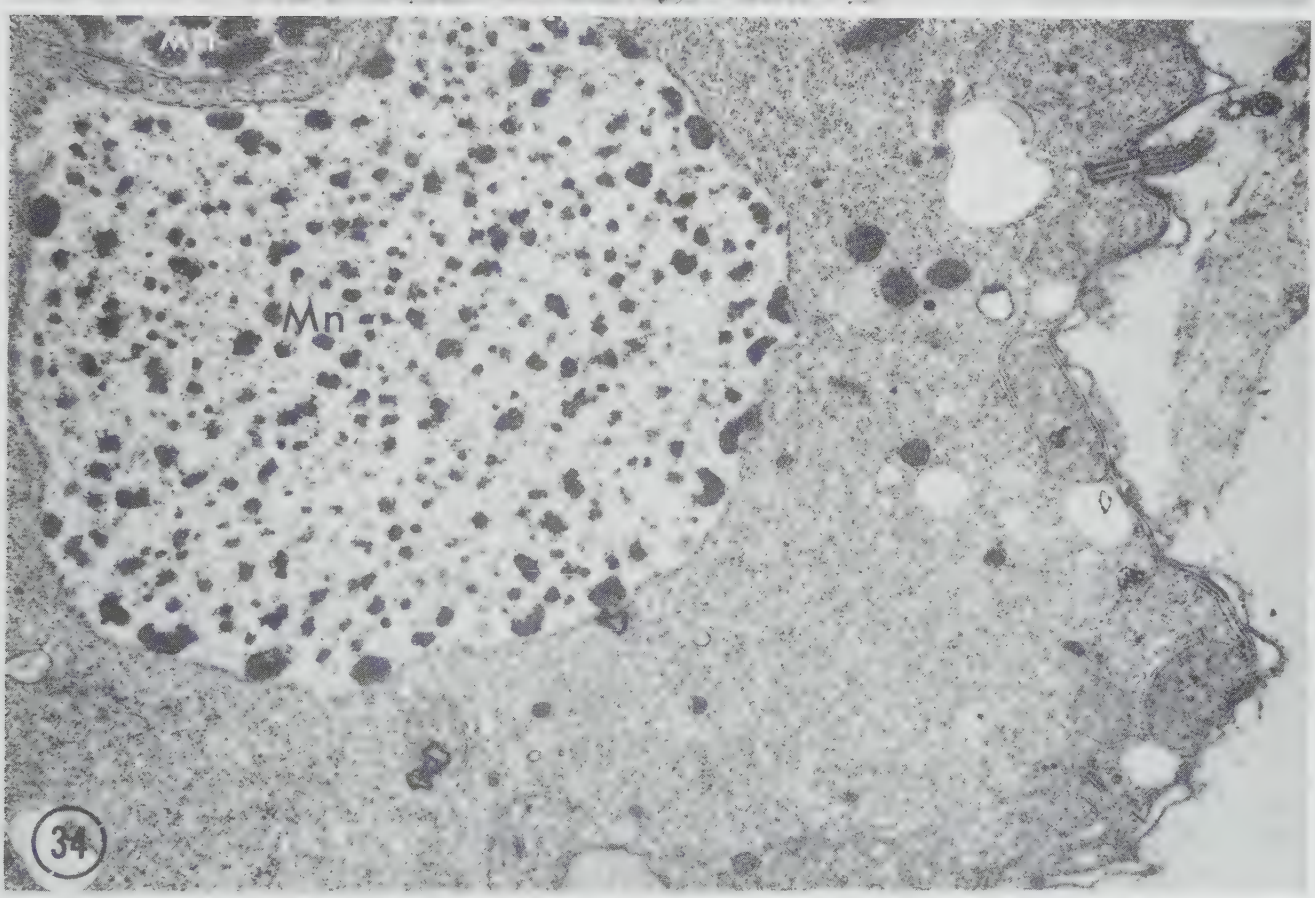
FIGURE 33 - Autoradiographie d'une cellule marquée 6 heures dans laquelle de nombreuses mitochondries sont radioactives. Le macronoyau (Mn) est en phase S. X 9 200.

FIGURE 34 - Autoradiographie d'une cellule marquée 15 minutes dans laquelle on voit deux mitochondries radioactives alors que le macronoyau (Mn) et le micronoyau (mn) ne le sont pas (phase G_1 ou G_2). X 12 400.

FIGURES 33 et 34 - Souche 1.
Thymidine ^3H d'activité spécifique 9,7 Ci/mM, à la dose de 200 µCi/ml. Exposition 5 semaines.



33

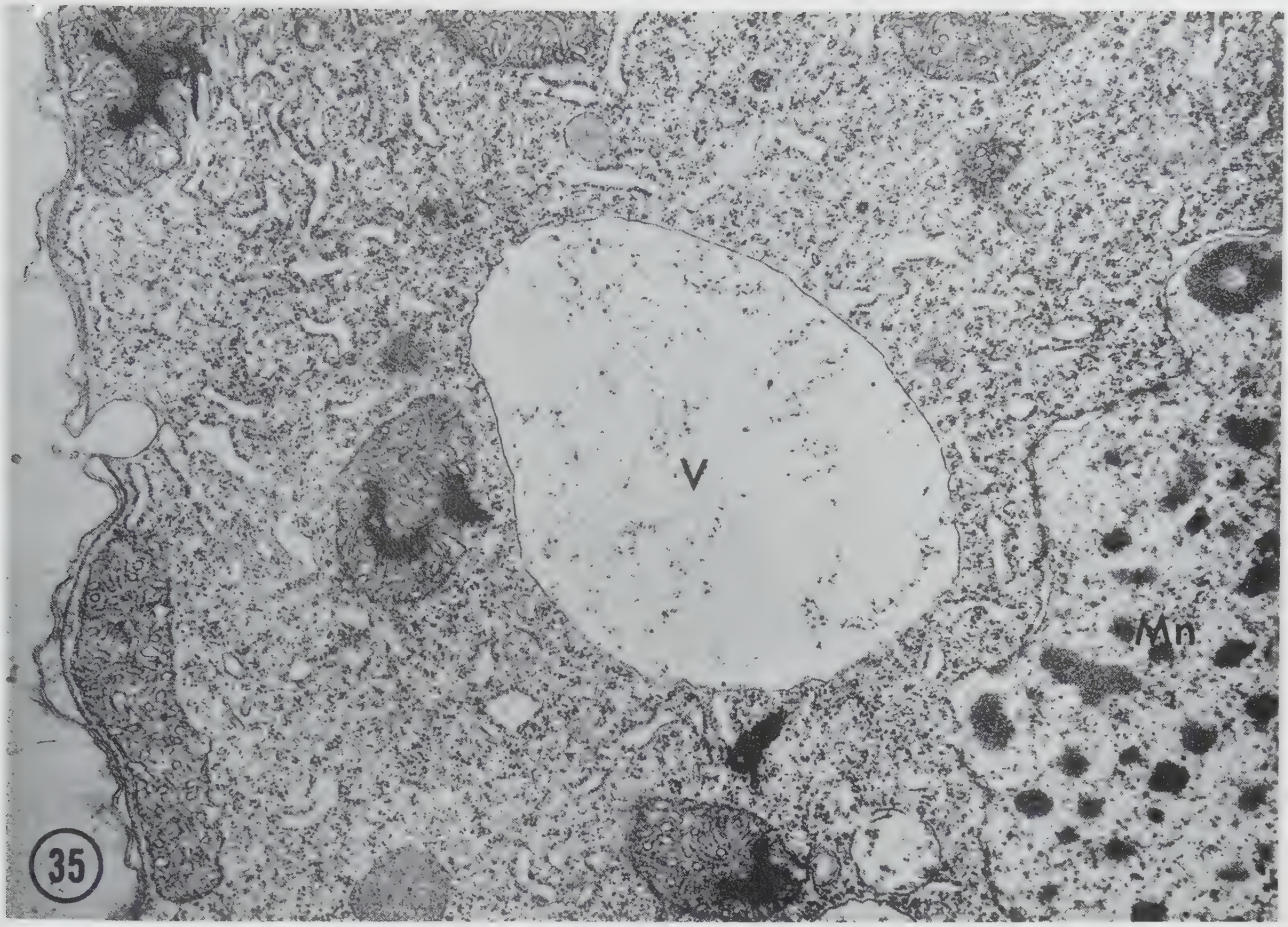


34

FIGURE 35 - Autoradiographie d'une cellule marquée 1 heure. Les mitochondries sont marquées alors que le macronoyau (Mn) ne l'est pas (noyau en phase G_1 ou G_2).

FIGURE 36 - Autoradiographie d'une cellule marquée 1 heure. Les mitochondries et la macronoyau (Mn) sont marquées ; le noyau est en phase S.

FIGURES 35 et 36 - Souche GL.
Thymidine ^3H d'activité spécifique 11,5 Ci/mM à la dose de 200 µCi/ml. Exposition 5 semaines. X 25 000.


V
Mn
35

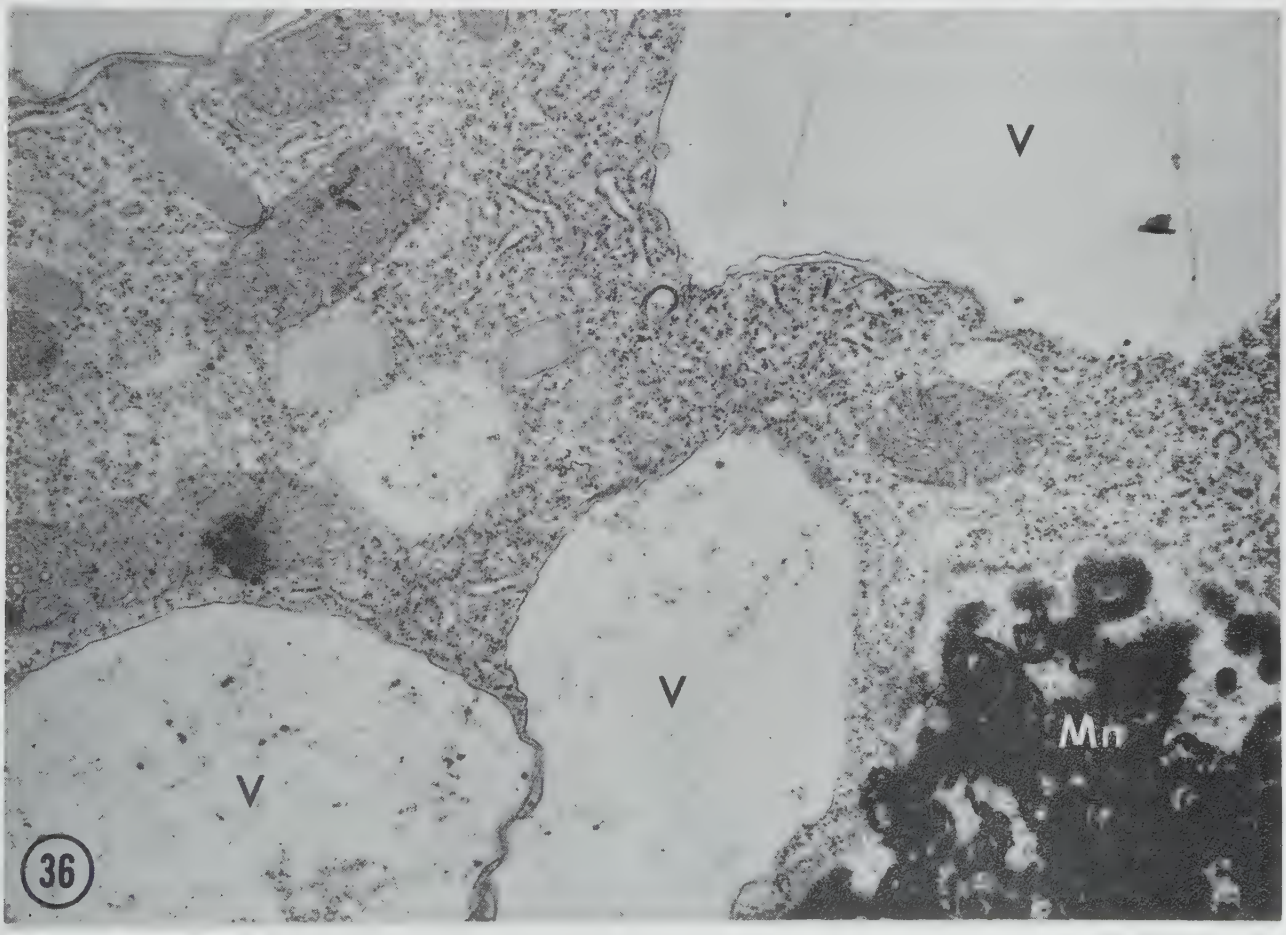
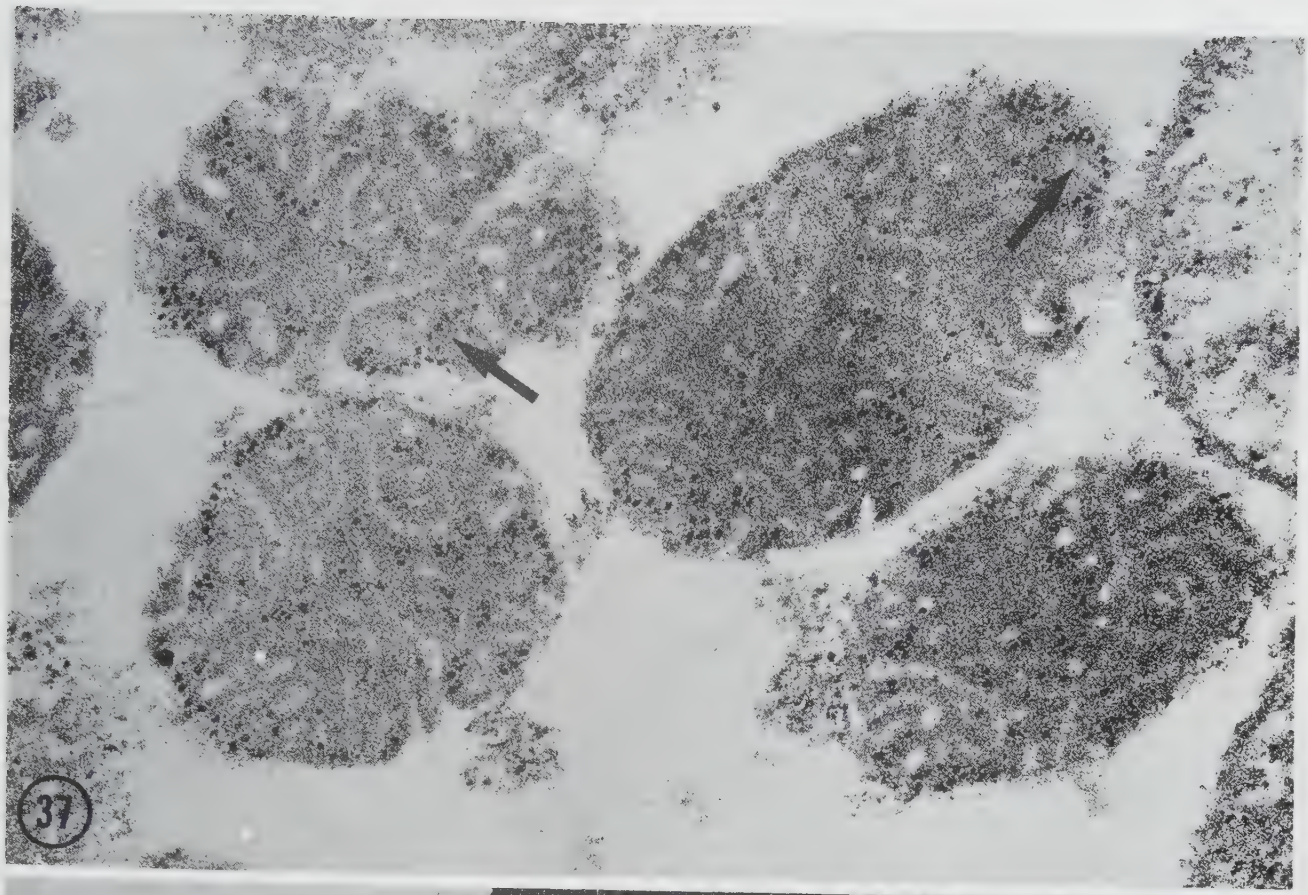

V
V
V
Mn
36

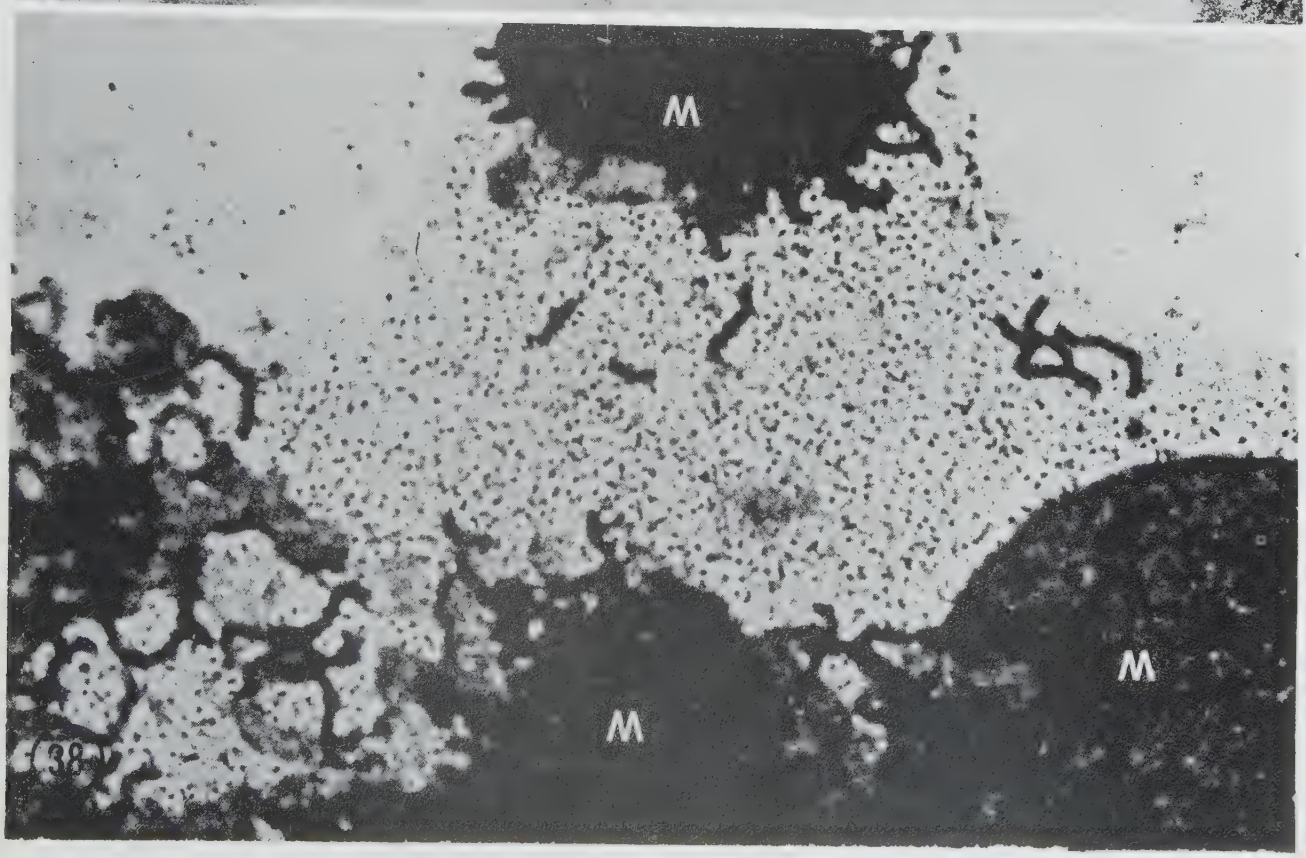
FIGURE 37 - Souche ST.

Coupe de culot de mitochondries isolées. Les ribosomes sont nombreux, souvent arrangés en polysomes (flèches). Fixation glutaraldéhyde 0,25 % dans un tampon phosphate 0,05 M ; coloration à l'hydroxyde de plomb selon Karnovsky. X 45 000.

FIGURE 38 - Souche ST. Technique de Miller.

Ribosomes mitochondriaux visibles en semis irrégulier près des membranes mitochondriales (M). X 35 000.


37


M
M
M

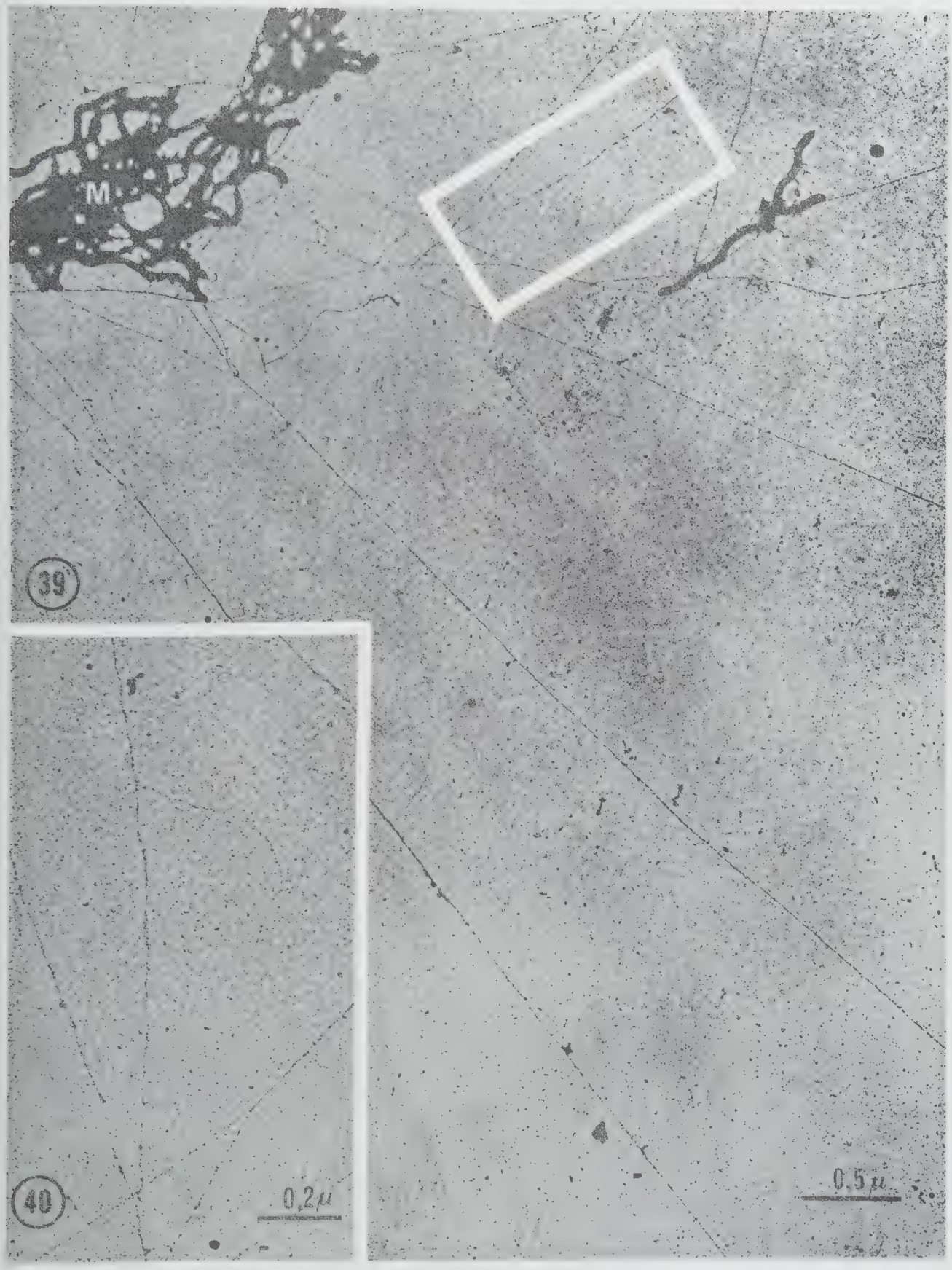
Souche ST. Technique de Miller.

Filaments d'ADN expulsés des mitochondries par choc osmotique et adsorbés après une courte centrifugation sur le film de carbone porte-objet.

FIGURE 39. Longs filaments d'ADN rattachés aux débris des membranes mitochondriales (M) (en haut à gauche). Certains filaments s'accolent en donnant des "ramifications longues" puis se séparent. La longueur totale d'ADN visible sur la figure est de 40 µ environ, mais cette dernière n'est qu'une vue très partielle de la préparation. X 35 000.

FIGURE 40. Détail de la figure 39.

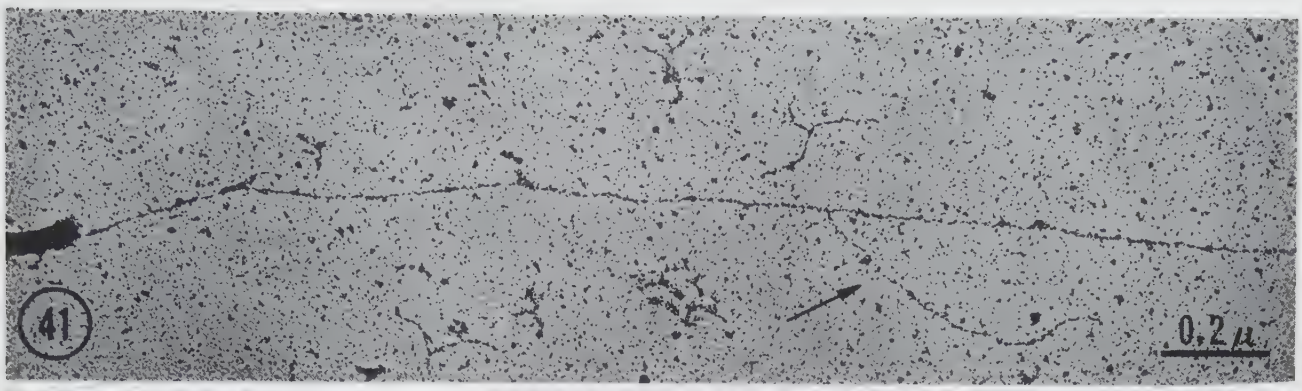
On peut voir deux ramifications : l'une "ramification longue" (en bas à droite) se présente comme une fourche à deux branches provenant d'un tronc commun rigide, plus épais que chacune des 2 branches, l'autre (près du centre) de type "ramification courte" est constituée par l'implantation, sur un filament d'ADN d'épaisseur uniforme, d'un filament grêle et sinueux de 0,4 µ de long. X 70 000.

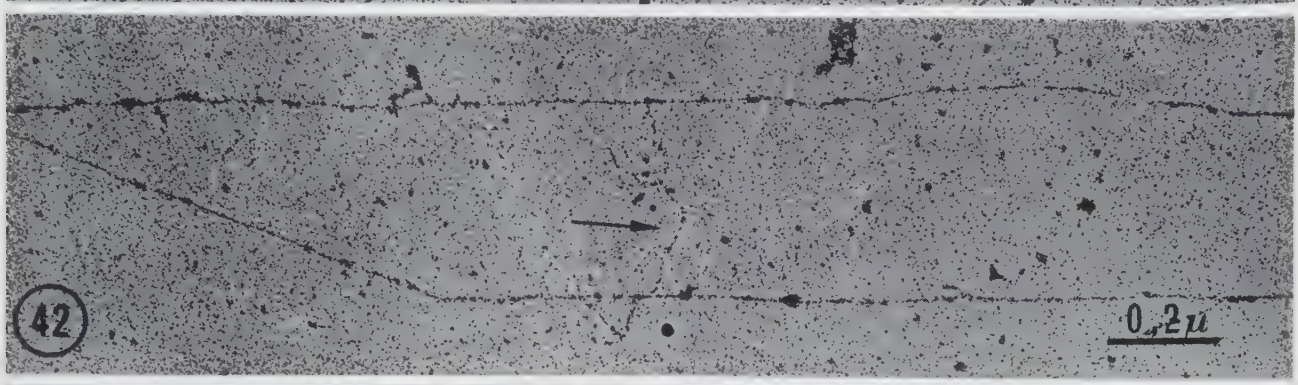

M
39
40
0,2μ
0,5μ

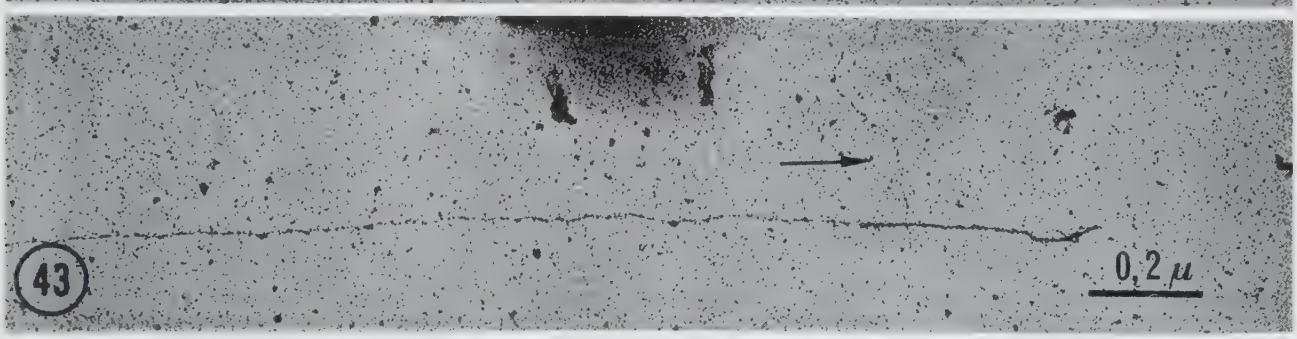
Souche ST. Technique de Miller.

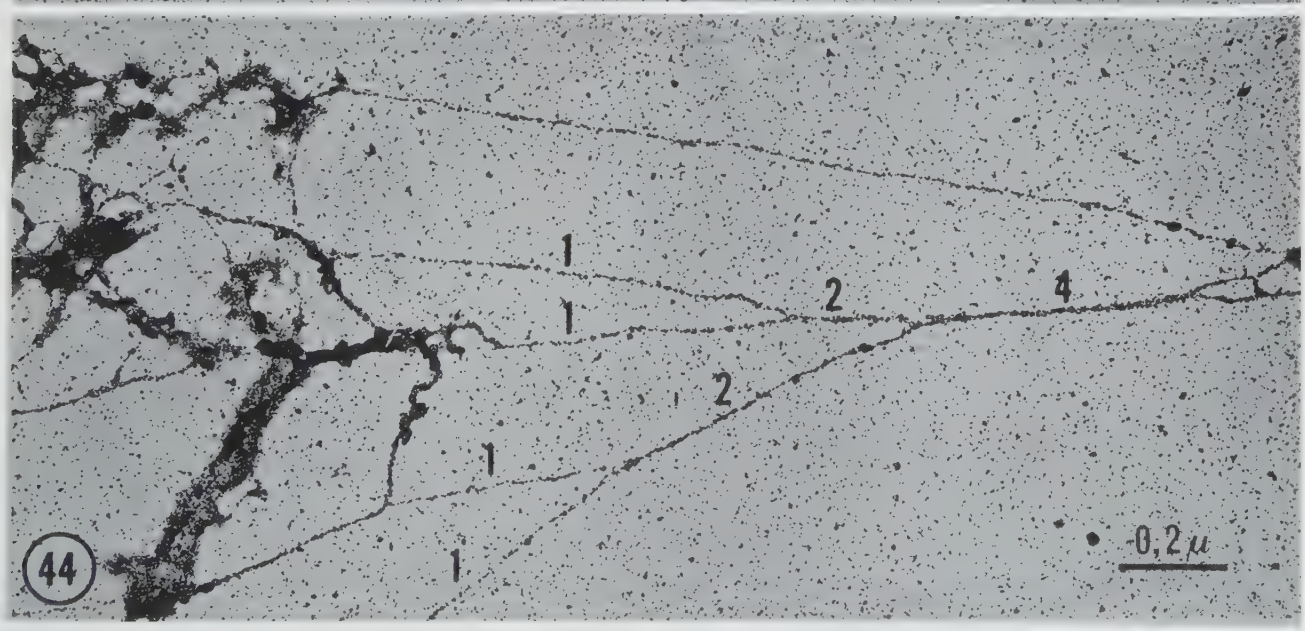
FIGURES 41, 42 et 43. Ramifications courtes de même type que celles décrites sur la figure 40. X 70 000.

FIGURE 44. Tronc épais (4) qui se divise dichotomiquement en 2 filaments moins épais (2) qui se séparent à leur tour en deux filaments uniques (1). Ces derniers sont vraisemblablement constitués d'une seule molécule. X 70 000


41
0,2 μ


42
0,2 μ


43
0,2 μ


44
1
1
2
4
2
1
1
0,2 μ

Souche ST. Technique de Miller.

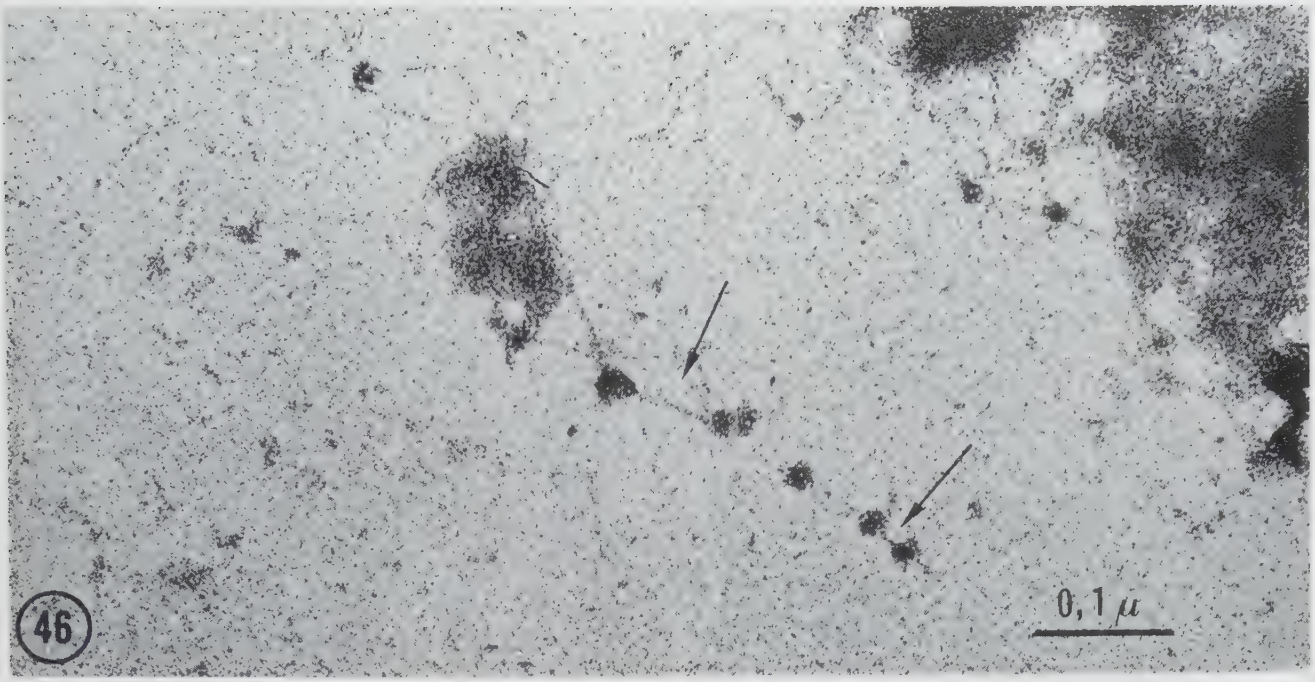
FIGURE 45. Les ribosomes sont éparpillés sur la préparation. Certains sont isolés, d'autres sont associés en polysomes (flèches), (M) mitochondrie.

X 50 000.

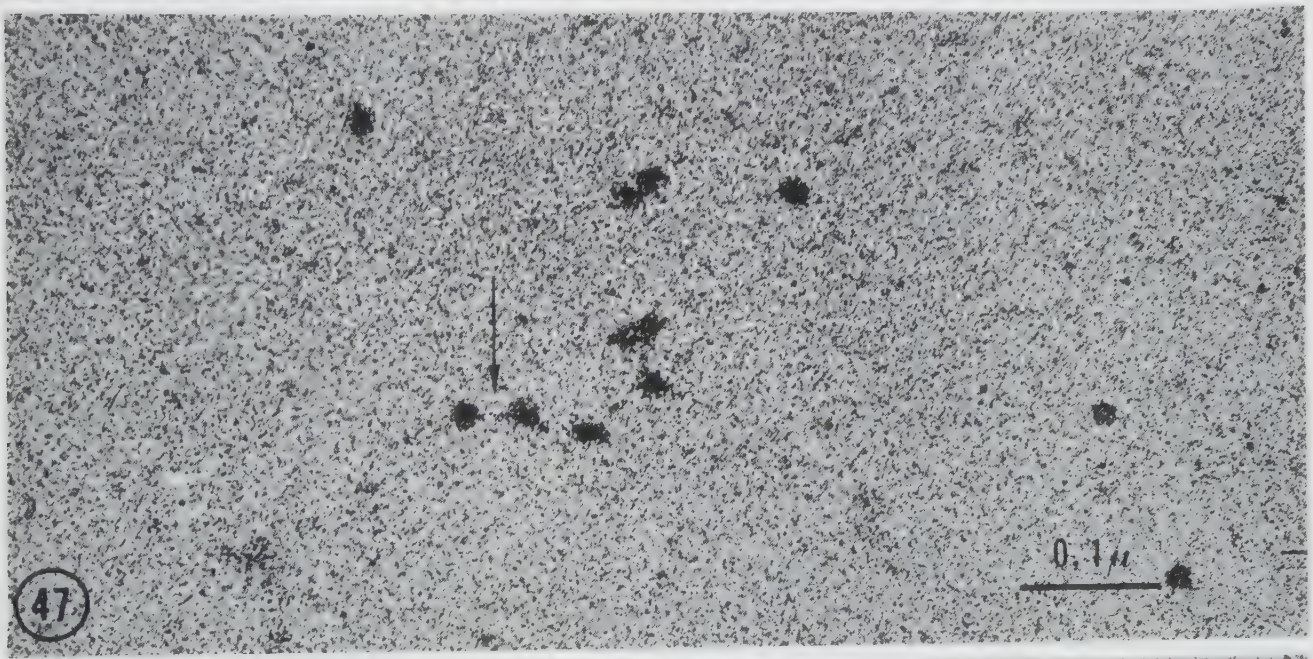
M
45

Souche ST. Technique de Miller.

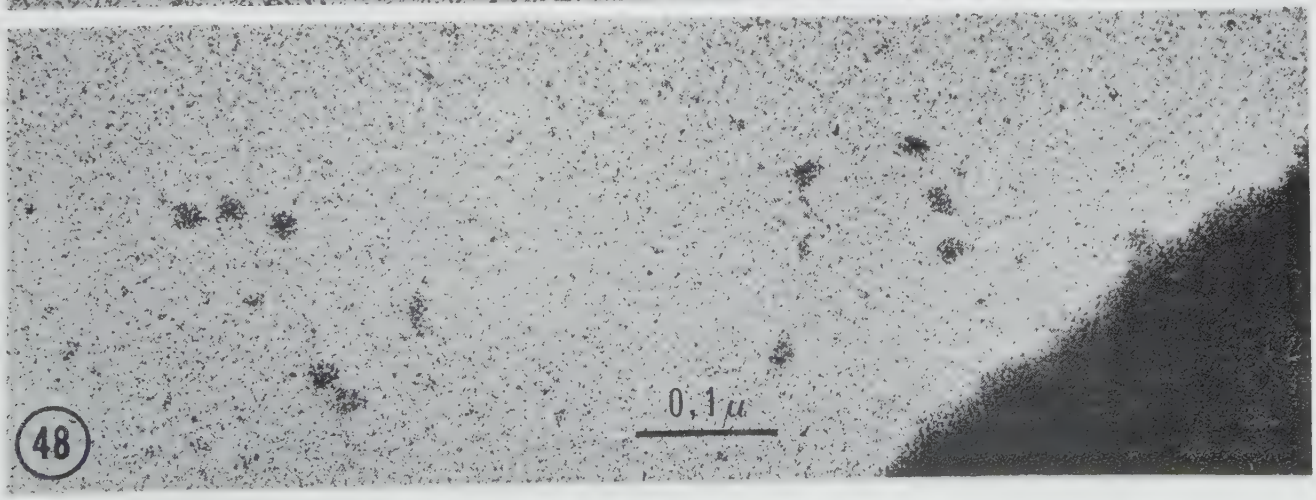
FIGURES 46, 47 et 48. Ribosomes associés en polysomes. Le fin filament (flèches) visible entre les ribosomes est interprété comme la molécule d'ARN messager. Ces polysomes sont situés à proximité des membranes mitochondriales. Aucun filament reconnaissable comme de l'ADN n'est visible dans leur voisinage. X 180 000. Figures 47 et 48, détail de la figure 45



46



47

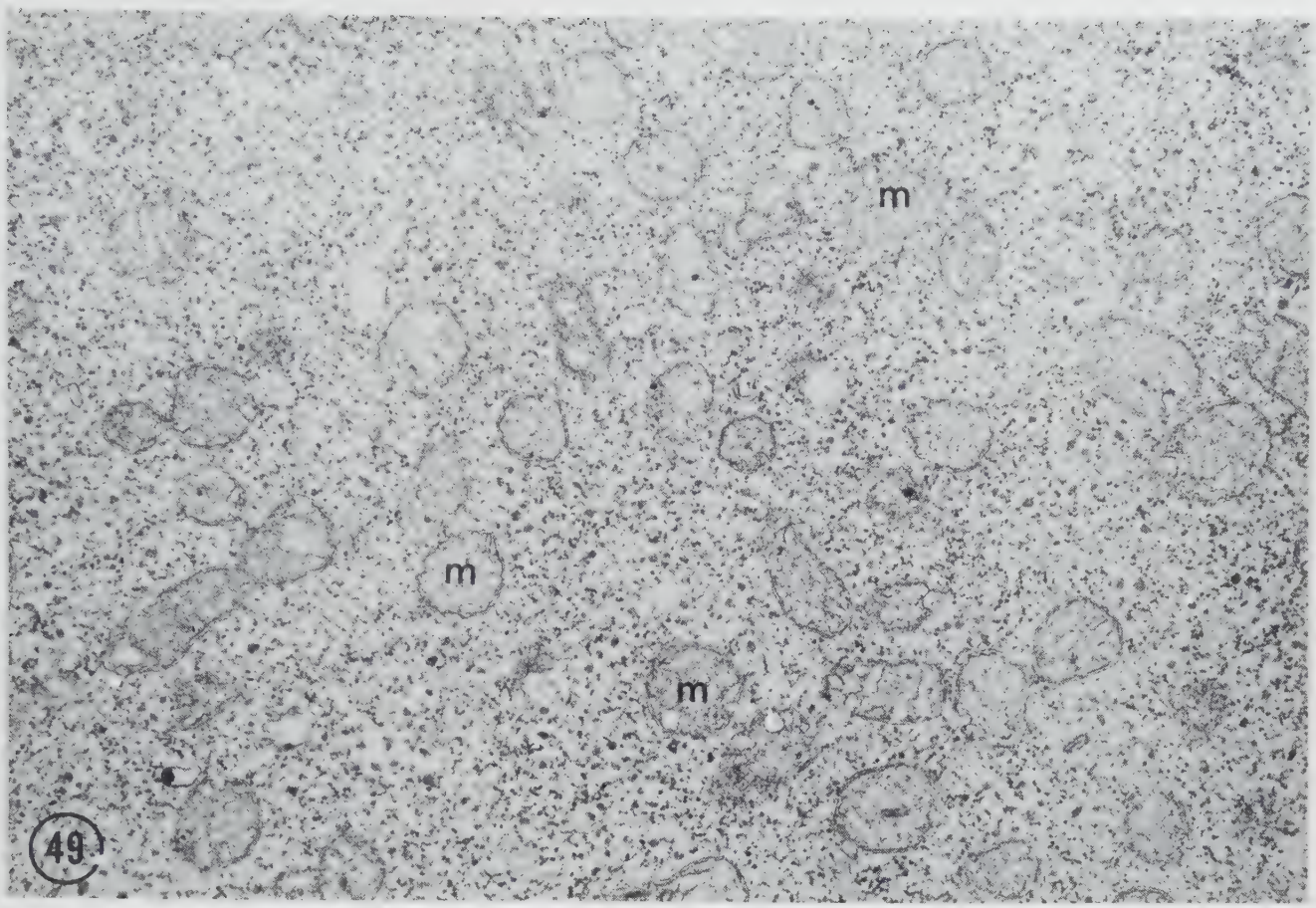


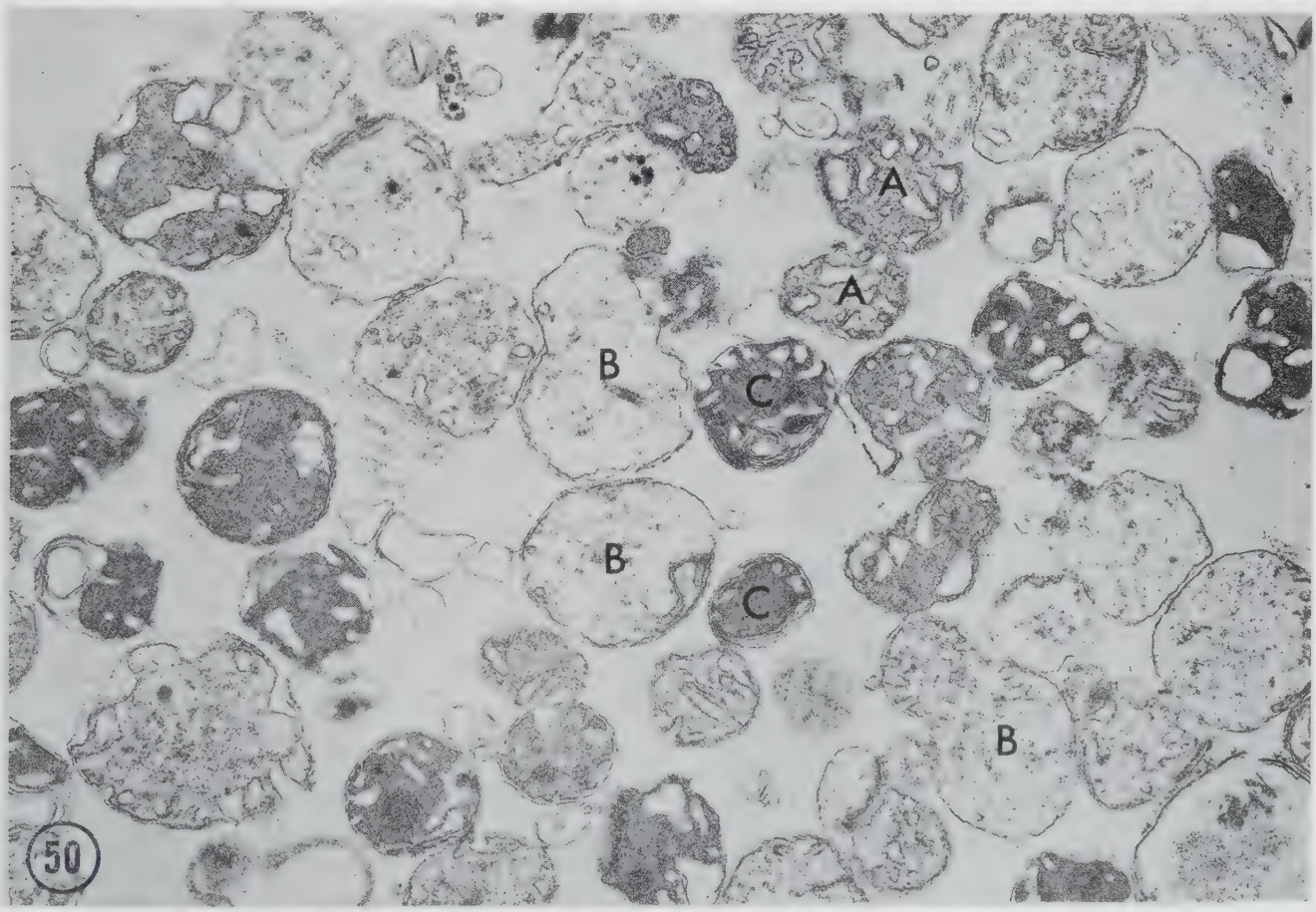
48

Souche ST. Effet du bromure d'éthidium.

FIGURE 49. Portion de cytoplasme de cellule traitée au bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml pendant 24 heures. Les crêtes des mitochondries (m) sont rares. X 30 000.

FIGURE 50. Mitochondries isolées à partir des cellules vues sur la figure 49. Les mitochondries montrent trois types de strucuture, A, B, C comparables à ceux décrits sur la figure 8. X 30 000.


m
m
m
49

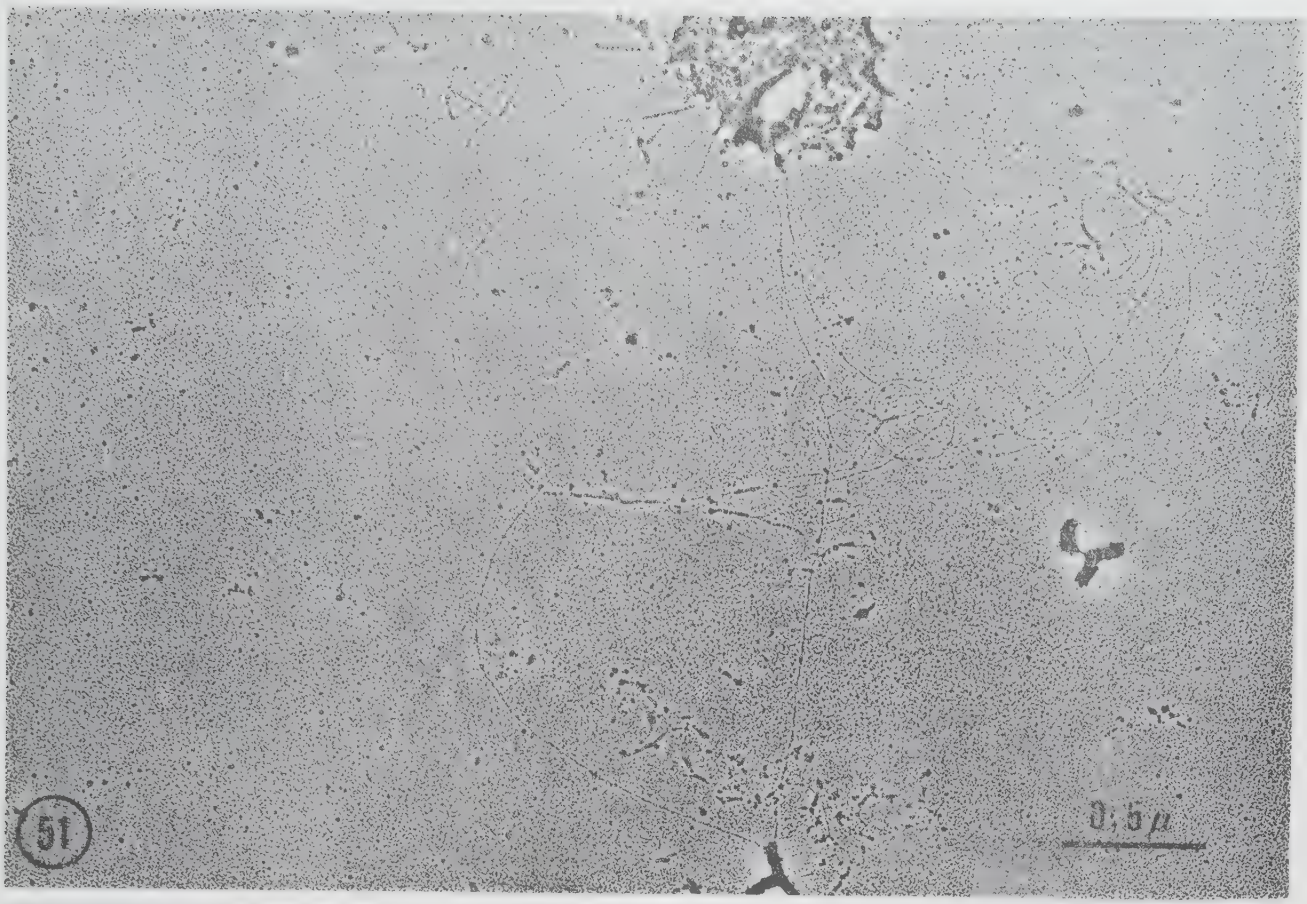

A
A
B
C
B
C
B
50

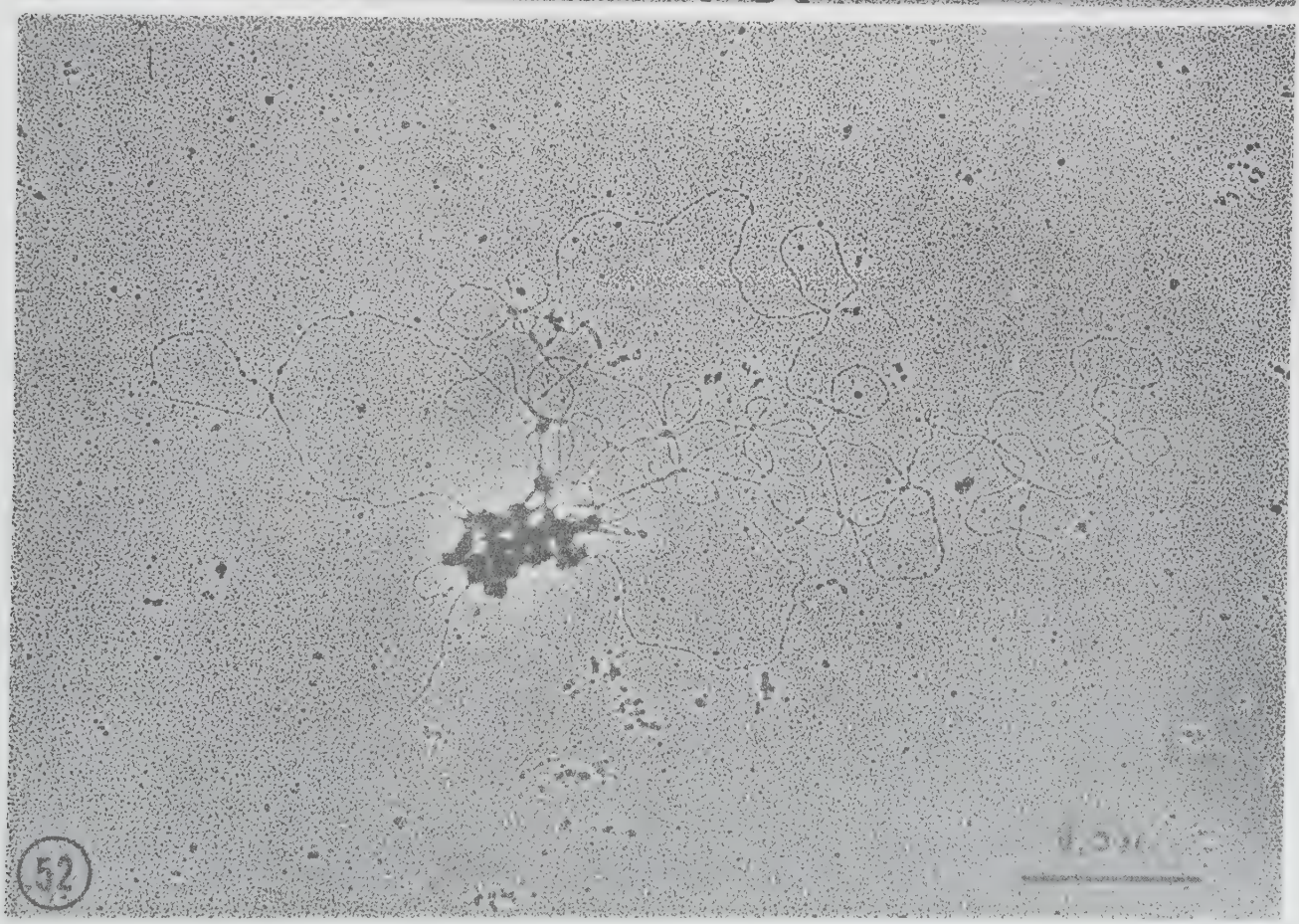
Souche ST. Effet du bromure d'éthidium.

FIGURES 51 et 52. Lyse par choc osmotique de mitochondries de cellules traitées 24 heures au bromure d'éthidum à la dose de 20 µg/ml (culot de mitochondries vu sur la figure 49).

La suspension mitochondriale est diluée 10 fois dans l'acétate d'ammonium 2M, laissée en attente 15 minutes sur la glace puis diluée encore 1 fois avec du cytochrome c à 0,02% dans l'eau avant d'être étalée sur de l'eau à 4°C. Ombrage à l'oxyde d'uranium.

La longueur de la totalité de l'ADN qui reste au voisinage de la mitochondrie éclatée est de 32,2 µ sur la figure 51 et de 38,2 µ sur la figure 52.


51
0,5 μ

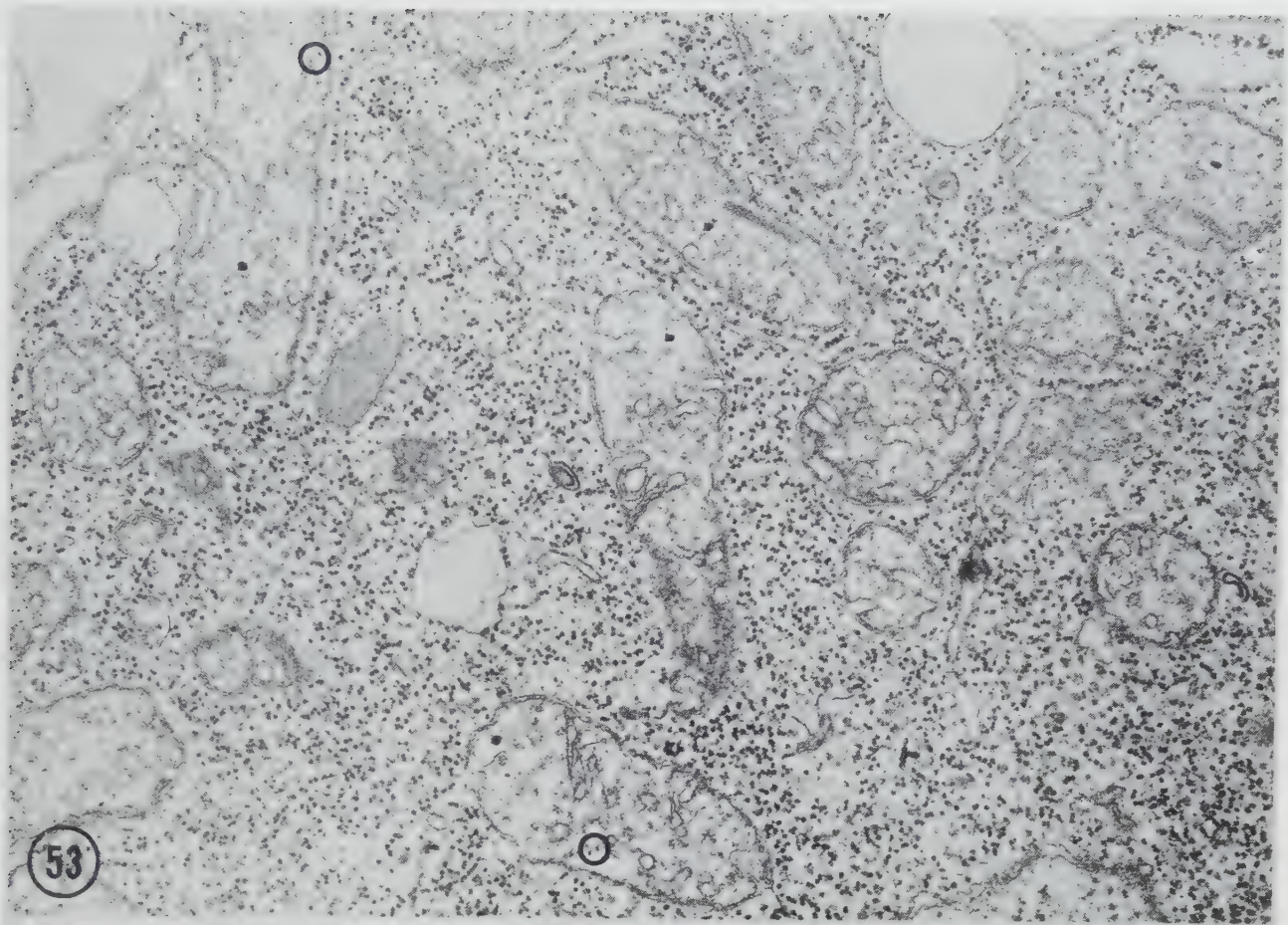

52

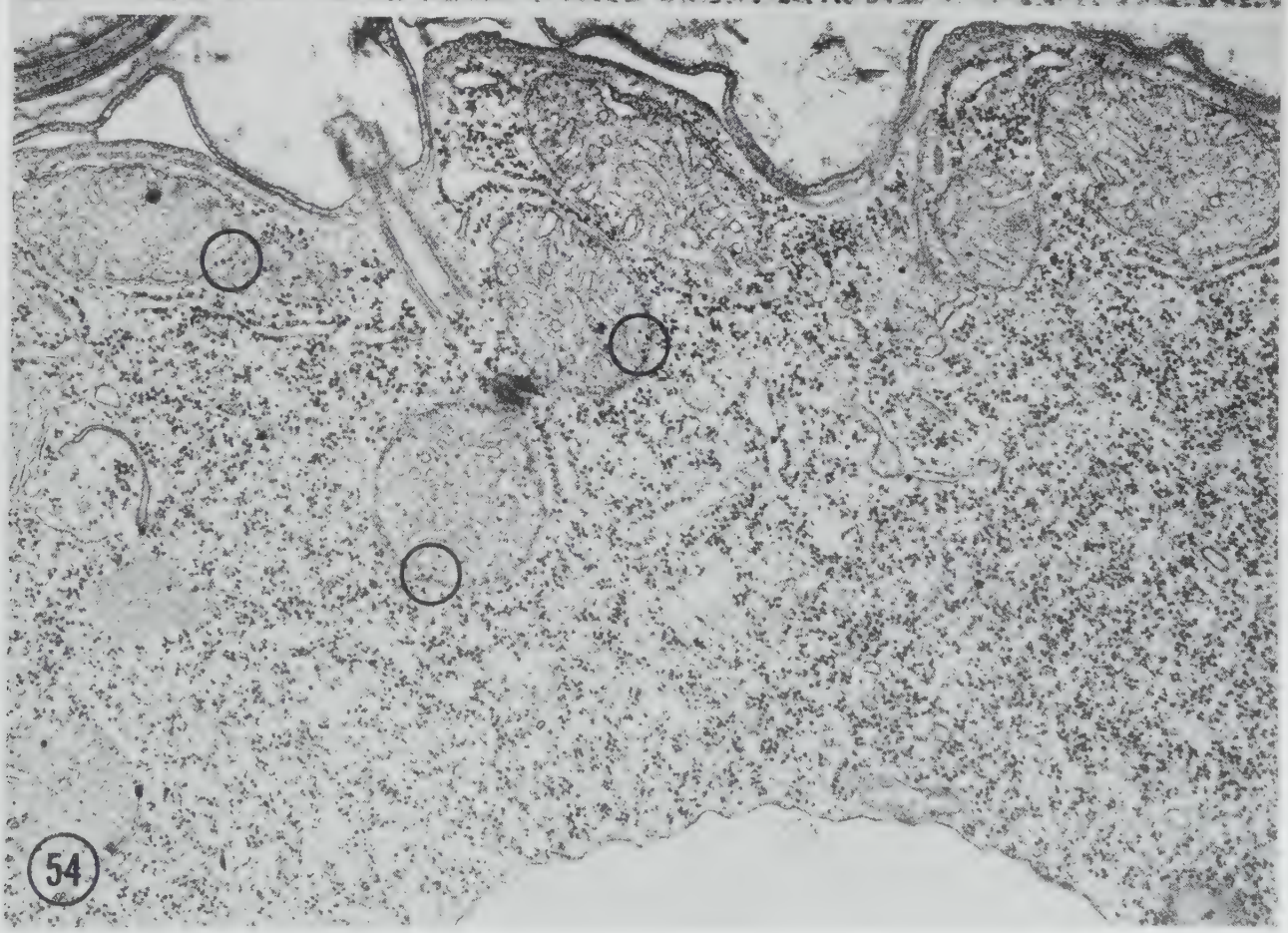
Souche ST. Effet réversible du bromure d'éthidium.

Cellules traitées pendant 18 heures au bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml, puis remises en culture sur du milieu normal, après élimination de l'inhibiteur.

FIGURE 53. 6 heures de croissance en milieu normal. Les mitochondries sont encore modifiées, mais les ribosomes réapparaissent (cercles). X 35 000.

FIGURE 54. 24 heures de croissance en milieu normal. Les mitochondries ont retrouvé leur état normal, avec crêtes et ribosomes mitochondriaux (cercles). X 35 000.


53


54

ANNEXE

1. La synthèse de l'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis*. Etude radioautographique quantitative au microscope électronique. (*J. Cell Biol.*, *39*, 369-381, 1968).

2. Modification des mitochondries et synthèse de l'ADN mitochondrial de *Tetrahymena pyriformis* après action du bromure d'éthidium. (*J. Microscopie*, *14*, 279-298, 1972).

LA SYNTHÈSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL CHEZ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

Etude Radioautographique Quantitative au Microscope Électronique

RENÉE CHARRET et JEAN ANDRÉ

From the Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, 91 Orsay, France

ABSTRACT

Electron microscopic radioautography has been used to study the synthesis of mitochondrial DNA after incorporation of thymidine-^{3}H by cultures in logarithmic phase of *Tetrahymena pyriformis* during periods ranging from 15 min to 12 hr. The great majority of silver grains are distributed over the macronuclei, the micronuclei, and the mitochondria. The intensity of the label over the entire mitochondrial population is a function of the length of the incubation period within the time interval considered. The intensity of the mitochondrial label was compared with that of the nuclear label. Mitochondria incorporate at the same rate whether the nuclei are synthesizing or not. This persistence of mitochondrial incorporation in the absence of nuclear incorporation excludes the hypothesis of a nuclear origin for mitochondrial DNA. We are not able to determine whether the apparent continuity of synthesis in the entire mitochondrial population of a cell actually represents a series of asynchronous discontinuities.

INTRODUCTION

Après avoir été longtemps contestée, l'existence de l'ADN cytoplasmique n'est plus à démontrer, et il est maintenant bien connu, à la suite d'un bon nombre de travaux (Hoff-Jörgensen et Zeuthen, 1952; Steinert, 1960; Chèvremont et al., 1961; Ris et Plaut, 1962; Chèvremont, 1963; Nass et Nass, 1963; Luck et Reich, 1964; Chèvremont, 1965; Nass et al., 1965; Kislev et al., 1965; Schuster, 1965; Bisalputra et Bisalputra, 1967; Granick et Gibor, 1967), que cet ADN est lié aux structures mitochondriales, kinétoplastiques, ou chloroplastiques. Cet ADN possède des propriétés biochimiques qui le différencient de l'ADN nucléaire (Suyama et Preer, 1965; Kroon, 1966; Sinclair, 1966; Moustacchi et Williamson, 1966; Borst et al., 1967 *a*, *b* et *c*; Dawid et Wolstenholme, 1967; Mounolou, 1967; Pikó et al., 1967): son poids moléculaire est très bas, et, pour un bon nombre d'organismes, sa densité de flottaison est faible, de même que le rapport des bases GC/AT. On sait aussi que sa molécule est le plus souvent circulaire, d'une longueur d'environ 5 μ (Nass, 1966; Sinclair et Stevens, 1966; Van Bruggen et al., 1966) et qu'il est dépourvu d'histones (Steinert, 1965).

L'existence d'ADN hors du noyau pose évidemment le problème de ses rapports avec l'ADN nucléaire: l'ADN cytoplasmique et l'ADN nucléaire ont-ils la même origine dans la cellule et, sinon, leur synthèse obéit-elle aux mêmes modalités chronologiques au cours du cycle cellulaire? Chèvremont (1963) envisage le

Reprinted from THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 1968, Vol. 39, No. 2, pp. 369 381 *Printed in U.S.A.*

premier ce problème. Dans des fibroblastes de poulet soumis à des conditions de cultures particulières, il voit une accumulation d'ADN dans les mitochondries. Il interprète ce fait comme montrant que l'ADN est normalement synthétisé par les mitochondries qui le transfèrent ensuite au noyau. Les travaux qui suivent apportent des conclusions différentes. Pour Bell et Mühlethaler (1964), l'ADN des mitochondries et des chloroplastes vient au contraire du noyau, au moins en partie. Pour les auteurs cités ci-dessous, l'ADN mitochondrial se synthétise sur place. En ce qui concerne la chronologie, les résultats obtenus sont de deux sortes: pour certains auteurs (Parsons, 1964, chez *Tetrahymena pyriformis*; Reich et Luck, 1966, chez *Neurospora crassa*; Evans, 1966, et Guttes et al., 1964 et 1967, chez *Physarum polycephalum*), la synthèse de l'ADN mitochondrial intervient pendant tout le cycle cellulaire, tandis que pour d'autres il y a synchronisation des deux synthèses, synchronisation parfaite comme le constatent Steinert et Steinert (1962) pour le kinétoplaste de *Trypanosoma mega*, ou synchronisation partielle comme le constate Cameron (1966) pour les mitochondries de *Tetrahymena pyriformis*.

Cette variété d'opinions nous a paru donner de l'intérêt au problème. Le présent travail a été entrepris pour réétudier par voie radioautographique au microscope électronique les rapports de la synthèse de l'ADN nucléaire avec celle de l'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis*. Le choix du matériel a été guidé par le fait que, chez ce Cilié, les noyaux (macronoyau et micronoyau) sont de localisation centrale dans la cellule alors que la plupart des mitochondries sont périphériques. Cette disposition favorable élimine tout risque de confusion dans l'interprétation des radioautographies entre la radioactivité nucléaire et la radioactivité mitochondriale, malgré le pouvoir séparateur faible à l'échelle des ultrastructures, de la méthode radioautographique au microscope électronique.

Plusieurs auteurs ont déjà utilisé ce système cellulaire mais, là aussi, les opinions divergent. Pour Parsons (1965) la synthèse d'ADN dans les mitochondries est continue, c'est-à-dire qu'elle n'est pas restreinte aux phases de synthèse nucléaire. A l'opposé, Cameron (1966), tout en reconnaissant que l'ADN mitochondrial se réplique durant la plus grande partie du cycle cellulaire, voit cette réplication augmenter pendant la synthèse de l'ADN micronucléaire. Enfin, Stone et Miller (1965) adoptent une position intermédiaire en admettant la possibilité d'une telle corrélation, mais sans la démontrer. Ces divergences ont motivé le travail que nous présentons ici.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Tetrahymena pyriformis, (variété I, type conjugant I) est maintenu en culture axénique à 28°C dans un milieu protéose-peptone (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) à la concentration de 1–2% (Plesner et al., 1964). Des repiquages quotidiens nous fournissent des populations en phase logarithmique de croissance dont le temps de doublement est d'environ 6 heures. A de telles cultures, nous ajoutons de la thymidine méthyle-^{3}H d'activité spécifique 9,7 Ci/mM à raison de 200 μ Ci/ml. Après l'addition du précurseur, les tubes de culture sont replacés à 28°C, pour des durées de 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 6 heures, ou 12 heures.

Pour la radioautographie, les Ciliés sont concentrés par centrifugation, fixés à la glutaraldéhyde à 1% dans un tampon phosphate 0,05 M pendant 20 minutes, puis au tétroxyde d'osmium à 2% dans un tampon identique pendant 1 heure. Ils sont ensuite préinclus dans un caillot de fibrine (Charret et Fauré-Fremiet, 1967). Les préinclusions sont déshydratées et incluses en Epon. La coupe est faite à l'ultrotome LKB avec un couteau de diamant en s'attachant à obtenir des séries de coupes d'épaisseur uniforme. Les coupes sont alors traitées pour la radioautographie de haute résolution. Pour cela, elles sont d'abord déposées sur une lame de verre recouverte d'une membrane de celloïdine (Granboulan, 1965), colorées pendant 15–20 minutes à l'acétate d'uranyle alcoolique, puis au citrate de plomb selon Reynolds (1963) pendant 5 minutes. Puis les lames ainsi traitées sont carbonées et recouvertes par trempage d'émulsion Ilford L4. Après une exposition de 5 semaines, les radioautographies sont révélées et fixées. Ensuite, la membrane de celloïdine est décollée du verre par flottage, et les coupes sont recueillies sur des grilles de maille 200. Enfin, la membrane de celloïdine est amincie dans l'acétate d'isoamyle. L'ensemble de cette technique se réfère à celle de Droz (1967).

Pour les digestions enzymatiques, les cellules incubées avec de la thymidine tritiée sont fixées dans du formol à 10% dans un tampon phosphate 0,05 M à 4°C pendant 20 minutes et traitées par la DNase, selon la technique de Swift et al., (1964) pendant 4 heures à 37°C. Les témoins sont incubés dans un milieu identique dépourvu de DNase. Ce traitement est suivi d'une fixation à l'acide osmique à 2% dans un tampon phosphate 0,05 M. Les coupes des cellules ainsi traitées sont radioautographiées comme nous l'avons décrit plus haut.

Les examens des radioautographies au microscope

électronique ont été faits de façon à éviter de photographier plusieurs fois la même section d'une cellule. Dans ce but, nous n'avons observé qu'une seule coupe par grille, en photographiant toutes les sections de Ciliés présentes dans cette coupe. Les grains d'argent ont été dénombrés en ne tenant compte que de ceux qui se trouvent situés en totalité ou en majeure partie au dessus d'un profil de mitochondrie.

Les tests statistiques de comparaison des pourcentages ont été effectués par la méthode du χ^2 de Pearson, le seuil de signification adopté étant le seuil habituel de 5%.

RÉSULTATS

Validité des Radioautographies

Dans les conditions de nos expériences, les grains d'argent se répartissent en presque totalité au dessus des profils de macronoyau, de micronoyau, et de mitochondries (Figs. 1 et 2). Le traitement préalable à la DNase les fait disparaître alors qu'ils sont encore visibles sur le témoin. Ces résultats, attendus, confèrent aux grains d'argent ainsi localisés une très haute significativité vis à vis de l'incorporation du précurseur radioactif dans l'ADN synthétisé pendant le temps de marquage par les trois catégories d'organites précités. Nous avons, en outre, noté la présence de grains d'argent sur quelques cinétosomes (Fig. 2).

Cependant, un petit nombre de grains d'argent n'obéit pas à cette répartition. Les uns se trouvent disséminés au hasard sur toute la surface de la coupe, y compris les espaces extracellulaires; ce sont des grains de fond, sans signification. Nous avons opéré de façon à maintenir leur nombre aussi bas que possible. Ce nombre ne dépasse pas un grain par 100 μ^2 de sorte que l'erreur qu'ils introduisent est négligeable, et nous n'avons pas jugé utile d'en tenir compte en appliquant une correction à nos dénombrements. Les autres se trouvent situés au dessus des profils de vacuoles. On sait que chez *Tetrahymena* en culture axénique, les vacuoles sont nombreuses et volumineuses (Figs. 1, 2, et 8). Ce sont des vacuoles digestives à contenu nutritif très dilué. Le nombre de grains d'argent superposés à ces vacuoles est supérieur au fond. Ces grains représentent sans doute des molécules du traceur en transit vers les lieux d'incorporation, molécules que la fixation et les opérations subséquentes n'auraient pas lavées. Ce marquage parasite n'a pas gêné nos dénombrements de façon sensible, puisque nous n'avons tenu compte que des grains situés en totalité ou presque au dessus des profils mitochondriaux.

Nos dénombrements concernent les grains d'argent superposés aux mitochondries. Il était donc important que la radioactivité des noyaux, souvent élevée avec les doses que nous avons employées (Figs. 1 et 9), ne provoque pas la formation de grains d'argent sur les mitochondries voisines. Une disposition heureuse fait que, chez *Tetrahymena pyriformis*, il n'y a que très rarement des mitochondries au voisinage des noyaux (Figs. 1, 8, et 9). La majorité des mitochondries est située sous la pellicule, à une distance des noyaux très supérieure au pouvoir séparateur de la méthode radioautographique, et il est fréquent de trouver de très grandes surfaces de coupe dépourvues de noyau mais riches en mitochondries (Fig. 2).

L'Intensité du Marquage des Mitochondries en Fonction du Temps

Afin d'étudier le marquage mitochondrial en fonction du temps, nous avons, pour chaque temps de marquage, compté le nombre de mitochondries radioactives dans une certaine surface de coupe et le nombre total des mitochondries dans la même surface. Les figures 3 à 6 montrent des portions représentatives de ces surfaces pour les temps de 30 minutes, 1 heure, 2 heures, et 6 heures, respectivement. Nous avons ensuite calculé les pourcentages et les intervalles de confiance (Tableau I). Ces résultats, reportés sur un graphique à coordonnées arithmétiques, nous donnent des points grossièrement alignés (Fig. 7). Donc, pour l'intervalle de temps considéré, qui couvre environ deux générations cellulaires, le pourcentage de mitochondries marquées augmente avec le temps de marquage.

L'Intensité du Marquage Mitochondrial en Fonction du Marquage des Noyaux

Le résultat précédent concerne l'ensemble des mitochondries de la population sans tenir compte de l'état du macronoyau ni du micronoyau. C'est donc une sommation des différentes situations du cycle cellulaire. Il est intéressant de rechercher si ce résultat se conserve si l'on ne considère que la fraction de population qui effectue, ou n'effectue pas, la synthèse de son ADN macronucléaire ou micronucléaire.

L'intensité de l'image radioactive des noyaux est variable selon les phases du cycle et permet de

TABLEAU I

Marquage Mitochondrial en Fonction du Temps

Temps	¼ h	½ h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
Nombre de mitochondries radioactives	9	12	49	141	159	242	363
Nombre total de mitochondries	567	539	859	1426	1144	816	860
Pourcentage et écart-type*	1.6±1.0	2.2±1.2	5.7±1.4	9.8±1.5	13.8±2.0	29.6±3.1	42.2±3.3

Intensité du marquage des mitochondries exprimée en pourcentage de mitochondries radioactives, pour des durées allant de 15 minutes à 12 heures.

* L'écart-type a été calculé selon la formule habituelle $\sqrt{\frac{pq}{n}}$

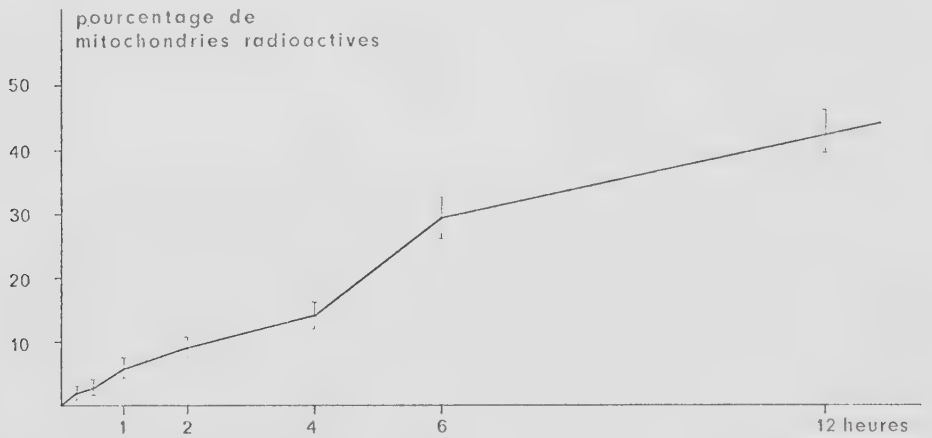


FIGURE 7 Représentation graphique de l'intensité du marquage des mitochondries en fonction du temps.

distinguer les noyaux peu ou pas marqués, en phase G_1 ou G_2 (Figs. 8 et 9) des noyaux marqués ou fortement marqués, en phase S (Figs. 1 et 9).

CAS DES NOYAUX NON MARQUÉS: Pour les temps de marquage courts, on trouve assez fréquemment des noyaux non marqués. Dans ce cas, on trouve néanmoins un marquage mitochondrial, dont l'intensité est fonction du temps, conformément à ce que l'on a vu au Tableau I et sur la figure 7. Les figures 8 et 9 donnent des exemples de mitochondries marquées dans des cellules où le macronoyau (Fig. 8) ou le micronoyau (Fig. 9) ne le sont pas. Il en est de même dans les figures où l'on voit les deux noyaux simultanément non marqués. Il n'y a donc pas, dans le marquage mitochondrial, de discontinuité synchronisée avec celle du marquage des noyaux.

CAS DU MACRONOYAU MARQUÉ: Nous avons cherché à reconnaître s'il existe une différence dans l'intensité du marquage mitochondrial entre les cellules dans lesquelles le macronoyau est marqué et celles où il ne l'est pas. Les nombres obtenus sont rassemblés dans le Tableau II. Nous avons éliminé les marquages de 15 minutes pour lesquels le marquage des mitochondries est très faible (Tableau I), et les marquages de 4 heures et davantage, pour lesquels le non marquage macronucléaire est impossible, le temps de génération étant d'environ 6 heures et la phase S d'environ 2 heures. Les deux pourcentages obtenus pour chaque temps sont comparés. Les différences sont, dans tous les cas, non significatives au seuil habituel de 5%. Il y a donc identité dans le marquage mitochondrial, que le macronoyau soit, ou non, en phase S.

DISCUSSION

Spécificité du Marquage par la Thymidine Tritiée

L'existence d'ADN cytoplasmique chez *Tetrahymena pyriformis* est signalée en 1960 par Scherbaum. Puis Parsons (1964), ainsi que Stone et Prescott (1964) localisent cet ADN dans les mitochondries en montrant que ces organites incorporent la thymidine tritiée.

Mais certains auteurs (Albach, 1967) ont émis l'objection que, chez *Tetrahymena* en croissance rapide, la thymidine-^{3}H n'est pas incorporée uniquement dans l'ADN. Cependant, nos images de noyaux dans lesquels le marquage nucléaire est intense (Fig. 1) indiquent que la quasi totalité de la thymidine est incorporée dans la chromatine. Nos images de micronoyaux en mitose montrent d'autre part une stricte localisation de la radioactivité dans les chromosomes. L'observation de grains d'argent dans les vacuoles digestives (Figs. 1 et 8) suggère la présence de thymidine en cours d'ingestion non éliminée lors des opérations qui suivent la fixation. Les grains vus sur les cinétosomes, signalent probablement la présence d'ADN au niveau des corpuscules basaux, ce qui confirme les observations de Randall et Disbrey (1965).

Ces divers faits, ajoutés à l'action de la DNase, font que l'on peut considérer sans erreur importante les grains d'argent superposés aux mitochondries comme dénotant de l'ADN synthétisé pendant la durée de l'expérience.

L'Origine de l'ADN Mitochondrial

Nous avons montré que *Tetrahymena pyriformis* en phase logarithmique de croissance incorpore la thymidine tritiée dans ses mitochondries pendant tout le cycle cellulaire et en particulier pendant les phases de non synthèse de l'ADN nucléaire. Ce résultat est conforme à celui de Parsons (1965) sur le même matériel, de Guttes et al. (1964 et 1967), Evans (1966) sur *Physarum polycephalum*, de Reich et Luck (1966) sur *Neurospora crassa*, de Chiang et Sueoka (1967) sur *Chlamydomonas*, et de Meyer et Ris (1966) sur des cultures de tissus. Ces résultats convergents indiquent clairement que la synthèse de l'ADN mitochondrial se fait sur place, et rend très improbable l'interprétation de Bell et Mühlethaler d'une cession d'ADN par le noyau aux mitochondries.

Nous avons montré d'autre part que la radioactivité de l'ensemble du chondriome d'une cellule augmente régulièrement, sans variation brusque, en raison directe du temps. On sait par contre, que les phases de synthèse de l'ADN du macronoyau comme du micronoyau sont des phénomènes brusques qui ont lieu à des périodes différentes au cours du cycle cellulaire (McDonald, 1962). La double indépendance cinétique de la synthèse de l'ADN mitochondrial vis à vis des synthèses nucléaires rend improbable, dans notre système cellulaire, le transport d'ADN des mitochondries vers le noyau, ainsi que le pensent Chèvremont et ses collaborateurs pour des cellules en culture.

Ainsi, nos résultats tendent à montrer que l'ADN des mitochondries de *Tetrahymena pyriformis* est proprement mitochondrial, qu'il se réplique sur place de façon autonome, indépendamment du noyau. Cependant, il est évident qu'un système de régulation accorde la vitesse de la synthèse de l'ADN du chondriome avec celle de l'ADN des noyaux de façon à maintenir constant, au long des générations cellulaires, le nombre des mitochondries par cellule et le rapport volume du chondriome sur volume des noyaux. Certaines conditions trophiques peuvent détruire momentanément cet équilibre (Moustacchi et Williamson, 1966) mais, à longue échéance, la lignée cellulaire ne peut se maintenir que s'il se rétablit.

La Continuité de la Synthèse d'ADN par les Mitochondries

Les résultats donnés par les Tableaux II et III sont en contradiction avec ceux de Cameron (1966) qui note une augmentation de la radioactivité des mitochondries pendant la phase S micronucléaire et de Stone et Miller (1965) qui estiment qu'il existe une corrélation entre la phase de synthèse de l'ADN nucléaire et celle de l'ADN mitochondrial. La contradiction vient sans doute du fait que ces auteurs utilisent des cultures en phase stationnaire qu'ils enrichissent en milieu frais en même temps qu'ils ajoutent le précurseur radioactif. Ils déclenchent ainsi une synthèse généralisée d'ADN à la fois dans les noyaux et les mitochondries, de sorte que la corrélation qu'ils observent est provoquée par les conditions trophiques. Nous pensons que le système que nous avons employé (cultures régulièrement entretenues en phase logarithmique), dans lequel l'addition du précurseur ne s'accompagne d'aucun choc trophique, est plus proche de la physiologie

TABLEAU II

Marquage Mitochondrial en Fonction du Marquage Macronucléaire

Temps	½ h		1 h		2 h	
Macronoyau	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué
Nombre de mitochondries radioactives	2	2	16	5	25	27
Nombre total de mitochondries	103	143	337	82	238	294
Pourcentage	1.9	1.4	4.7	6.1	10.5	9.1
Comparaison des pourcentages	Non sign.*		Non sign.		Non sign.	

TABLEAUX II et III Marquage mitochondrial en fonction du marquage des noyaux. (Tableau II, macronoyau; Tableau III, micronoyau.) On a comparé, pour chaque temps de marquage, le pourcentage des mitochondries radioactives dans le cas du noyau non marqué avec celui du noyau marqué. Les tests de comparaison des pourcentages ont été effectués par la méthode classique du χ^2 de Pearson, le seuil de signification adopté étant le seuil habituel de 5%.

* Non sign. : différence non significative.

TABLEAU III

Marquage Mitochondrial en Fonction du Marquage Micronucléaire

Temps	½ h		1 h		2 h		4 h	
Micronoyau	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué
Nombre de mitochondries radioactives	1	3	11	12	11	23	7	7
Nombre total de mitochondries	20	180	269	293	93	217	83	114
Pourcentage	5.0	1.7	4.1	4.0	11.8	10.5	9.6	6.0
Comparaison des pourcentages	Non sign.*		Non sign.		Non sign.		Non sign.	

Voir légende sous Tableau II.

* Non sign. : différence non significative.

normale des cellules et qu'il perturbe moins les phases de synthèse de l'ADN.

Notre résultat s'oppose de même aux observations faites par Bronchart et al. (1966) sur des cellules méristématiques de *Sinapis* pour lesquelles ils mettent en évidence une synchronisation de la synthèse de l'ADN des mitochondries et de l'ADN nucléaire. De même, Steinert et Steinert (1962) démontrent chez *Trypanosoma mega* une synchronisation de la synthèse de l'ADN du noyau et de celle de l'ADN du kinétoplaste. Cette dernière différence est intéressante. Le kinétoplaste des Trypanosomidés peut être considéré comme l'unique mitochondrie à ADN de la cellule. On peut penser que l'évolution n'aurait pas conservé la lignée si noyau et kinétoplaste n'étaient pas préparés ensemble à effectuer leur division. Quoique n'étant pas la seule manière d'y parvenir, le synchronisme de la réplication des deux stocks d'ADN assure parfaitement ce résultat. La situation est différente chez *Tetrahymena* où une population d'environ 700 mitochondries assure beaucoup plus facilement l'héritage des cellules-filles en mitochondries. La cytodiérèse donne à chaque cellule-fille plusieurs centaines de mitochondries dont chacune possède son propre stock d'ADN. Il n'apparaît pas comme évolutivement important que les cycles de réplication de l'ADN des différentes mitochondries soient synchrones ni qu'ils soient accordés avec ceux des noyaux.

Nous devons d'ailleurs souligner le fait que la continuité de synthèse que nous avons mise en évidence n'est valable que pour le chondriome pris dans son ensemble. Il nous est impossible d'examiner une mitochondrie individuellement, et nous ne pouvons déterminer si la continuité que nous observons n'est qu'une sommation de

discontinuités asynchrones, ou si chaque mitochondrie a réellement une synthèse continue d'ADN, sans phase de repos, à la façon des bactéries en croissance rapide.

Nous tenons à remercier MM. B. Droz et P. Granboulan de nous avoir initiés à la technique radioautographique et M. P. Lazar pour l'aide apportée dans l'interprétation statistique des résultats; M. B. Droz nous a utilement conseillés pendant la rédaction de ce manuscrit.

Ce travail fait partie d'une thèse de doctorat ès-Sciences Naturelles devant être soutenue á la Faculté des Sciences d'Orsay.

Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle du Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé No. 86 et Recherche Coopérative sur Programme No. 21) et de la Direction des Recherches et Moyens d'Essais (contrat No. 590:67).

Received for publication 7 March 1968, and in revised form 6 July 1968.

BIBLIOGRAPHIE

ALBACH, R. A. 1967. Incorporation of tritium from thymidine-methyl-H^3 into DNA, RNA, lipids and protein in logarithmic and stationnary phase *Tetrahymena pyriformis*, Strain W. *J. Protozool.* 14:271.

BELL, P. R., and K. MÜHLETHALER. 1964. Evidence for the presence of deoxyribonucleic acid in the organelles of the egg cells of *Pteridium aquilinum*. *J. Mol. Biol.* 8:853.

BISALPUTRA, T., and A. A. BISALPUTRA. 1967. Chloroplast and mitochondrial DNA in a brown alga *Egregia menziesii*. *J. Cell Biol.* 33:511.

BORST, P., A. M. KROON, and G. J. C. M. RUTTENBERG. 1967 *a*. Mitochondrial DNA and other forms of cytoplasmic DNA. *In* Genetic Elements Properties and Function. D. Shugar, editor. Academic Press Inc., New York. 81–115.

BORST, P., G. J. C. M. RUTTENBERG, and A. M. KROON. 1967 *b*. Mitochondrial DNA. I. Preparation and properties of mitochondrial DNA from chick liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 149:140.

BORST, P., E. F. J. VAN BRUGGEN, G. J. C. M. RUTTENBERG, and A. M. KOON. 1967 *c*. Mitochondrial DNA. II-Sedimentation analysis and electron microscopy of mitochondrial DNA from chick liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 149:156.

BRONCHART, R., G. BERNIER, and W. A. JENSEN. 1966. Localisation par autoradiographie au microscope électronique des lieux de synthèse du DNA dans les cellules méristématiques de *Sinapis alba* L. (Crucifères). *J. Microscopie.* 5:36a.

CAMERON, I. L. 1966. A periodicity of tritiated-thymidine incorporation into cytoplasmic deoxyribonucleic acid during the cell cycle of *Tetrahymena pyriformis*. *Nature.* 209:630.

CHARRET, R., and E. FAURÉ-FREMIET. 1967. Technique de rassemblement de microorganismes: préinclusion dans un caillot de fibrine. *J. Microscopie.* 6:1063.

CHÈVREMONT, M. 1963. Cytoplasmic deoxyribonucleic acids: their mitochondrial localization and synthesis in somatic cells under experimental conditions and during the normal cell cycle in relation to the preparation for mitosis. *In* Cell Growth and Cell Division. R. J. E. Harris, editor. Academic Press Inc., New York. 2:323–333.

CHÈVREMONT, M. 1965. Metabolism and synthesis of DNA studied by autohistoradiography in animal cells under normal and experimental conditions. *In* Isotopes in Experimental Pharmacology. L. J. Roth, editor. University of Chicago Press, Chicago, Ill. 117–132.

CHÈVREMONT, M., R. BASSLEER, and E. BAECKELAND. 1961. Nouvelles recherches sur les acides désoxyribonucléiques dans des cultures de fibroblastes refroidies puis réchauffées. Etude cytophotométrique et histoautoradiographique. Localisation cytoplasmique d'ADN. *Arch. Biol.* 72:501.

CHIANG, K. S., and N. SUEOKA. 1967. Replication of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardi* during vegetative cell cycle: its mode and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 57:1506.

DAWID, I. B., and D. R. WOLSTENHOLME. 1967. Ultracentrifuge and electron microscope studies on the structure of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 28:233.

DROZ, B. 1967. Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude radioautographique quantitative en microscopie électronique. *J. Microscopie.* 6:201.

EVANS, T. E. 1966. Synthesis of a cytoplasmic DNA during the G2 interphase of *Physarum polycephalum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22:678.

GRANBOULAN, P. 1965. Comparison of emulsions and techniques in electron microscope radioautography. *In* The Use of Radioautography in Investigating Protein Synthesis. C. P. Leblond and K. B. Warren, editors. Academic Press Inc., New York. 43–63.

GRANICK, S., and A. GIBOR. 1967. The DNA of chloroplasts, mitochondria, and centrioles. *In* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. J. N. Davidson and W. E. Cohn, editors. Academic Press Inc., New York. 143–186.

GUTTES, E. W., and S. GUTTES. 1964. Thymidine incorporation by mitochondria in *Physarum polycephalum*. *Science.* 145:1057.

Guttes, E. W., P. C. Hanawalt, and S. Guttes. 1967. Mitochondrial DNA synthesis and the mitotic cycle in *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 142:181.

Hoff-Jörgensen, E., and E. Zeuthen. 1952. Evidence of cytoplasmic deoxyribosides in the frog's egg. *Nature.* 169:245.

Kislev, N., H. Swift, and L. Bogorad. 1965. Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in Swiss chard. *J. Cell Biol.* 25:327.

Kroon, A. M. 1966. Protein synthesis in mitochondria. M. D. Thesis. Amsterdam, Drukkerij Noordholland, Hoorn.

Luck, D. J. L., and E. Reich. 1964. DNA in mitochondria of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 52:931.

McDonald, B. B. 1962. Synthesis of deoxyribonucleic acid by micro- and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 13:193.

Meyer, R. R., and H. Ris. 1966. Incorporation of tritiated thymidine and tritiated deoxyadenosine into mitochondrial DNA of chick fibroblasts. *J. Cell Biol.* 31:76A.

Mounolou, J. C. 1967. Role d'un ADN spécifique dans le déterminisme génétique et physiologique des mitochondries de la levure. Thèse. Université de Paris.

Moustacchi, E., and D. H. Williamson. 1966. Physiological variations in satellite components of Yeast DNA, detected by density gradient centrifugation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23:56.

Nass, M. M. K. 1966. The circularity of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 56:1215.

Nass, S., and M. M. K. Nass. 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J. Cell Biol.* 19:593.

Nass, M. M. K., S. Nass, and B. A. Afzelius. 1965. The general occurrence of mitochondrial DNA. *Exptl. Cell Res.* 37:516.

Parsons, J. A. 1964. The division of mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 23:70A.

Parsons, J. A. 1965. Mitochondrial incorporation of tritiated thymidine in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 25:641.

Pikó, L., A. Tyler, and J. Vinograd. 1967. Amount, location, priming capacity, circularity and other properties of cytoplasmic DNA in sea urchin eggs. *Biol. Bull.* 132:68.

Plesner, P., L. Rasmussen, and E. Zeuthen. 1964. Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. *In* Synchrony in Cell Division and Growth. E. Zeuthen, editor. Interscience Publishers Inc., New York. 543–563.

Randall, J., and C. Disbrey. 1965. Evidence for the presence of DNA at basal body sites in *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 162:473.

Reich, E., and D. J. L. Luck. 1966. Replication and inheritance of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 55:1600.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208.

Ris, H., and W. Plaut. 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 13:383.

Scherbaum, O. H. 1960. Possible sites of metabolic control dividing during the induction of synchronous cell division. *Ann. Acad. Sci. N. Y.* 90:565.

Schuster, F. L. 1965. A deoxyribose nucleic acid component in mitochondria of *Didymium nigripes*, a slime mold. *Exptl. Cell Res.* 39:329.

Sinclair, J. H. 1966. Mitochondrial DNA and other low molecular weight cellular DNA's. Ph.D. Thesis. University of Chicago, Chicago, Illinois.

Sinclair, J. H., and B. J. Stevens. 1966. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 56:508.

Steinert, M. 1960. Mitochondria associated with the kinetonucleus of *Trypanosoma mega*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8:542.

Steinert, M. 1965. L'absence d'histones dans le kinétonucleus des Trypanosomes. *Exptl. Cell Res.* 39:69.

Steinert, M., and G. Steinert. 1962. La synthèse de l'ADN au cours du cycle de division de *Trypanosoma mega*. *J. Protozool.* 9:203.

Stone, G. E., and O. L. Miller, Jr. 1965. A stable mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Exptl. Zool.* 159:33.

Stone, G. E., and D. M. Prescott. 1964. Cytoplasmic DNA in *Tetrahymena*. *J. Protozool. Suppl.* 11:24.

Suyama, Y., and J. R. Preer, Jr. 1965. Mitochondrial DNA from Protozoa. *Genetics.* 52:1051.

Swift, H., B. J. Adams, and K. Larsen. 1964. Electron microscope cytochemistry of nucleic acids in *Drosophila* salivary glands and *Tetrahymena*. *J. Roy. Microscop. Soc.* 83:161.

Van Bruggen, E. F. J., P. Borst, G. J. C. M. Ruttenberg, M. Gruber, and A. M. Kroon. 1966. Circular mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 119:437.

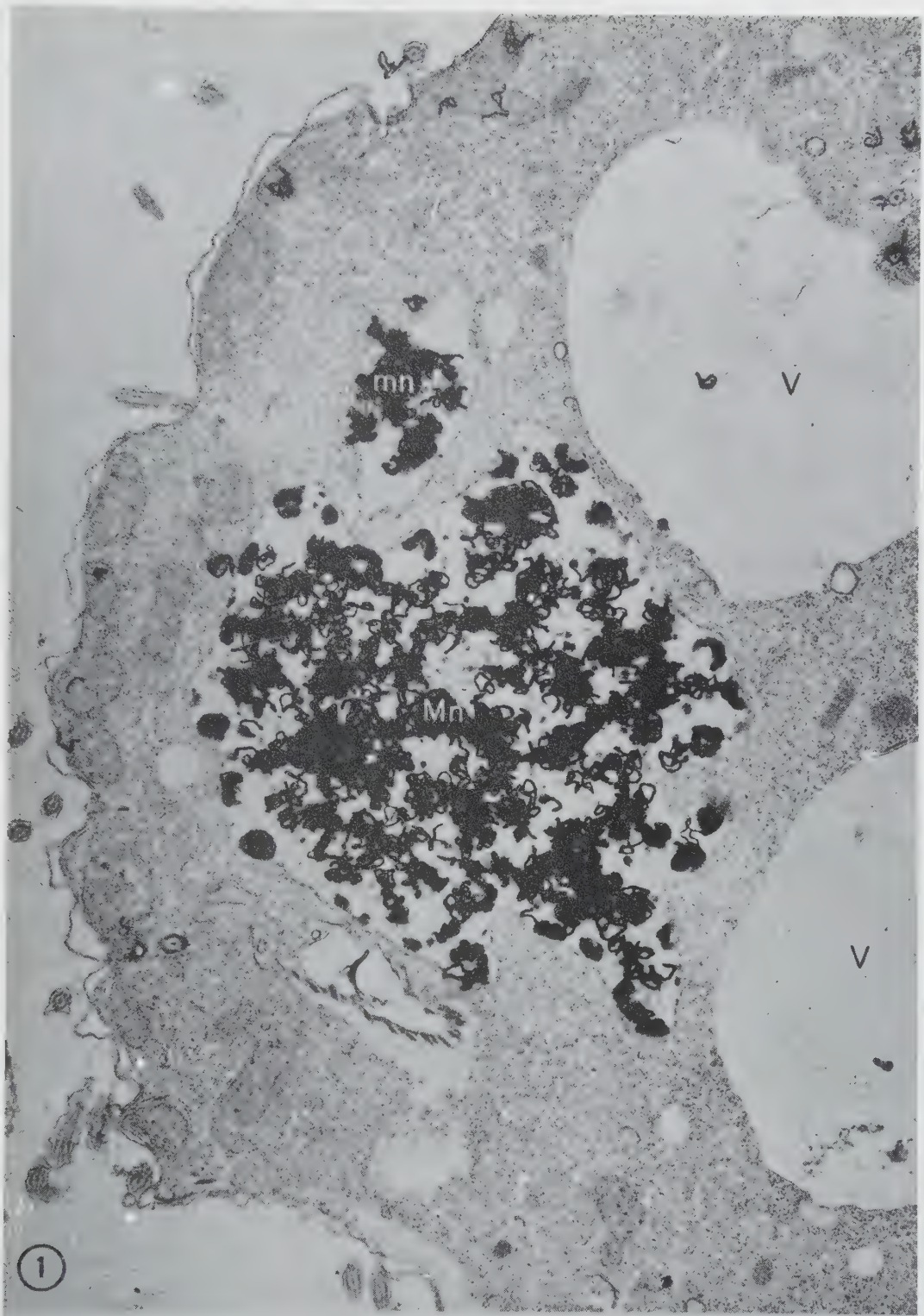


FIGURE 1 Radioautographie montrant le macronoyau (*Mn*) et le micronoyau (*mn*) très fortement marqués. La moitié environ des mitochondries est également marquée. L'intensité du marquage des noyaux et la localisation stricte des grains d'argent au dessus des chromosomes du micronoyau confirment l'incorporation de la thymidine ^{3}H dans l'ADN. Deux grains d'argent s'observent sur une vacuole (*V*). Marquage de 12 heures, exposition de 5 semaines. × 11,200.

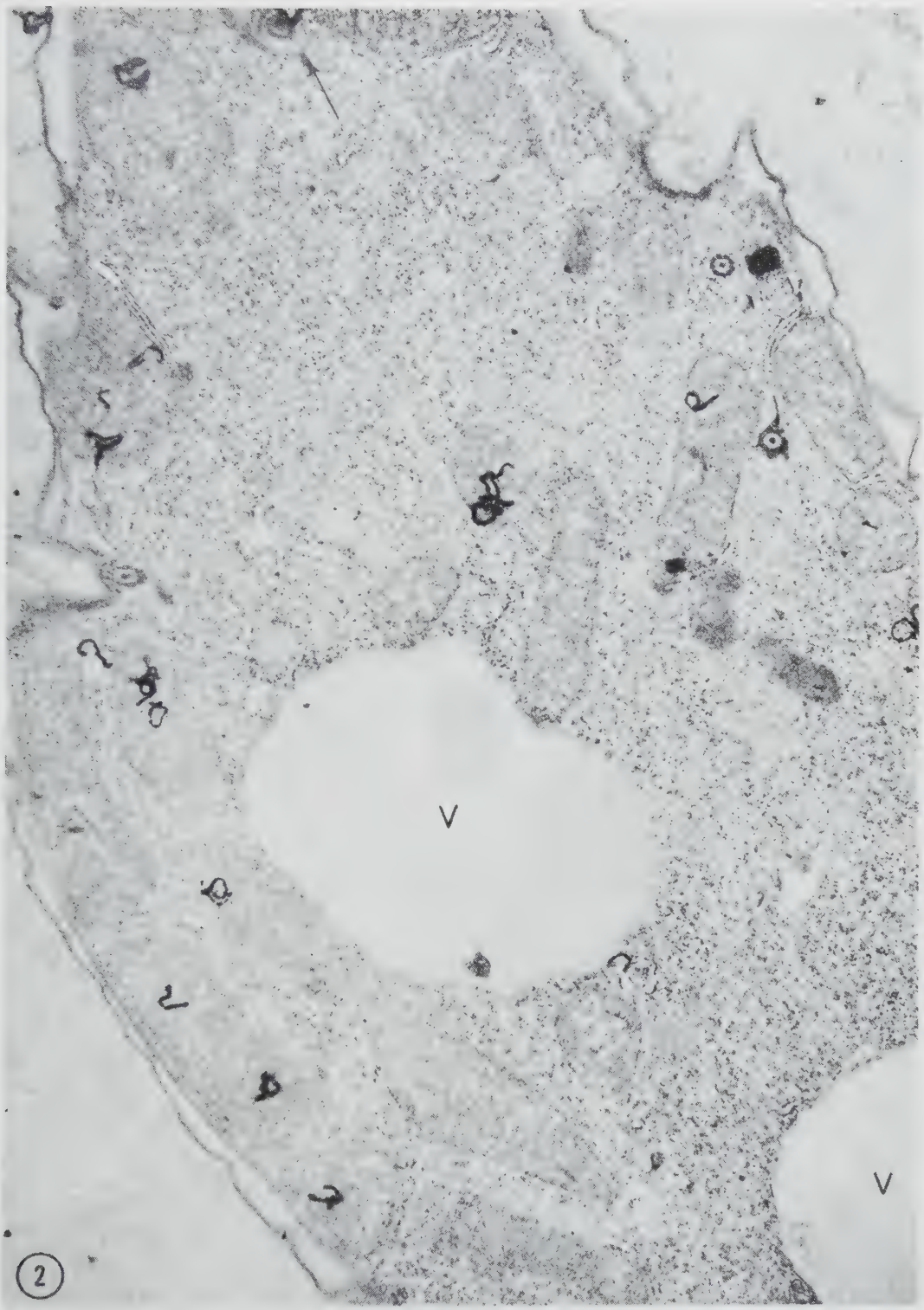
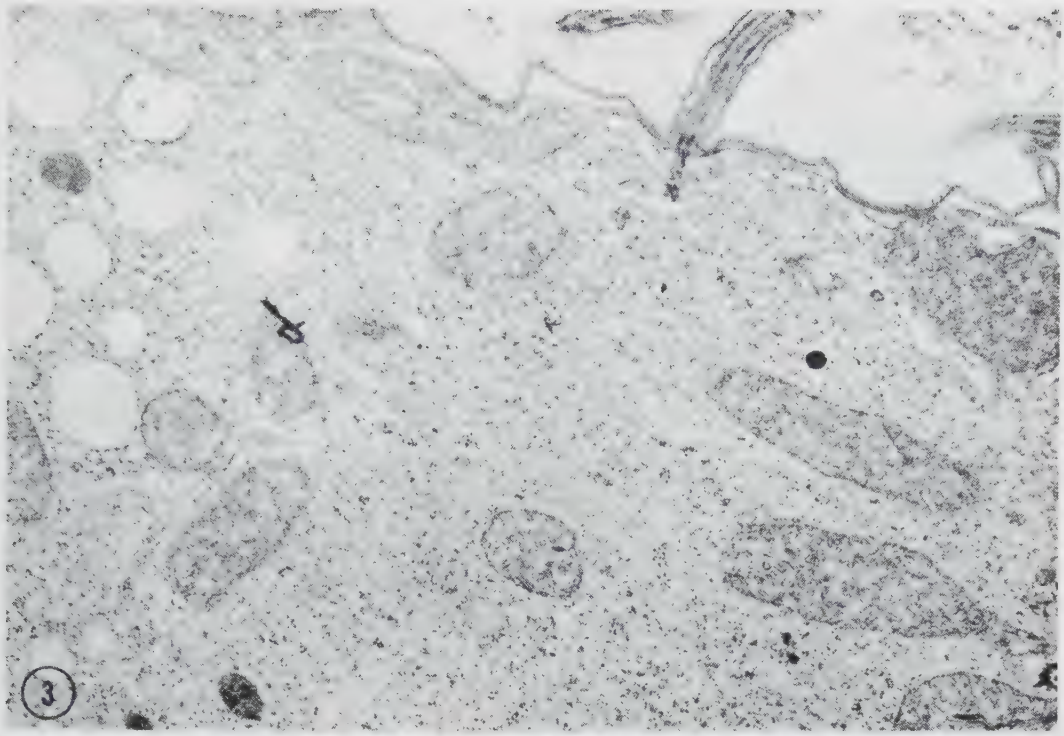
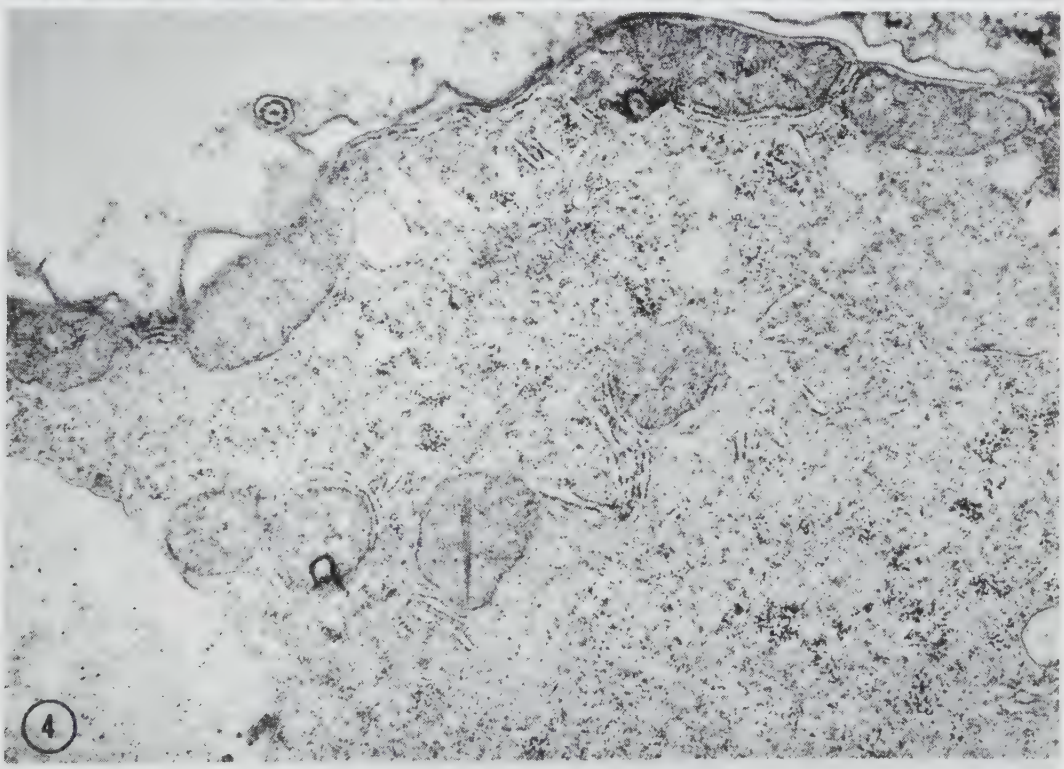
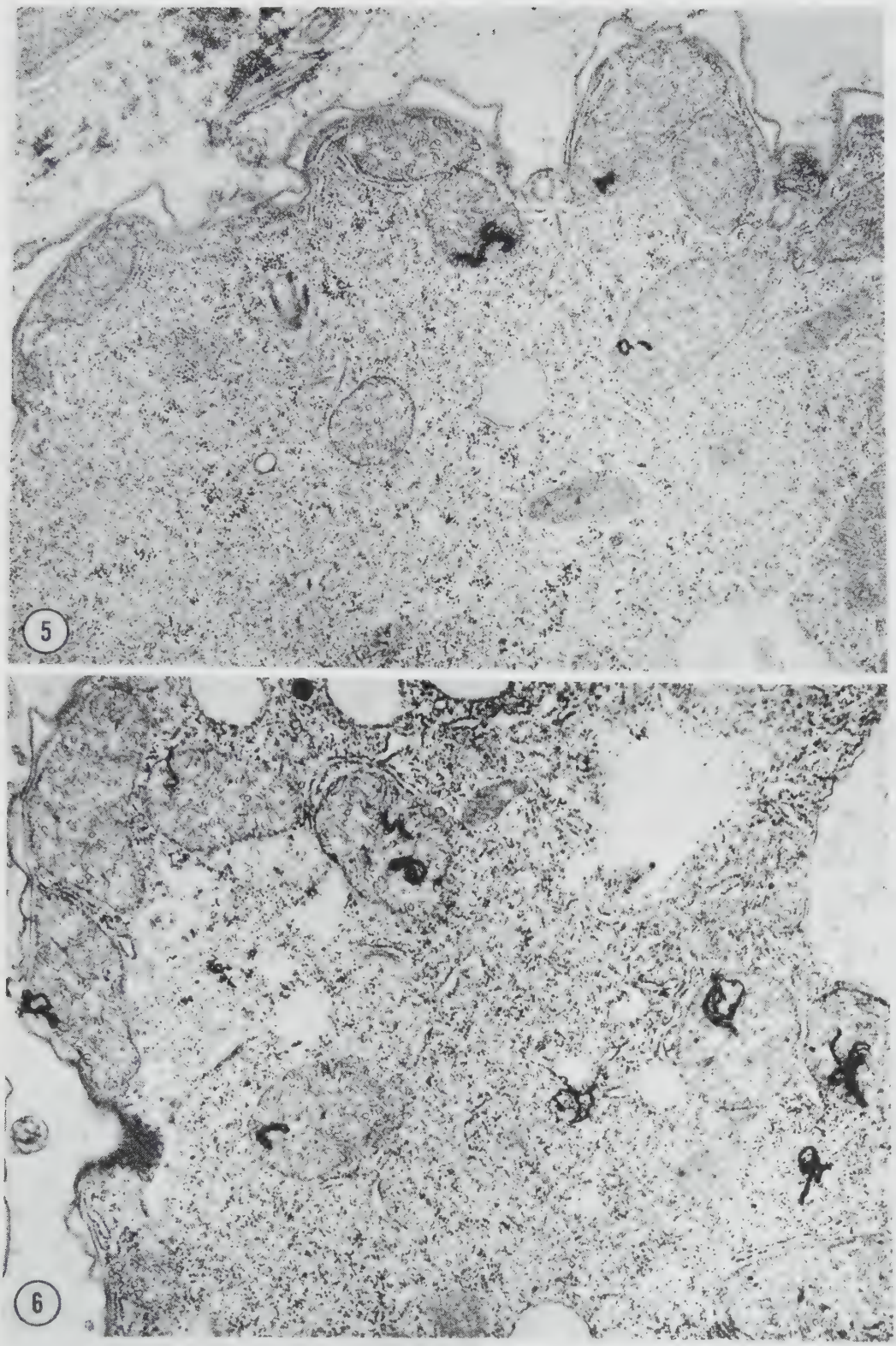


FIGURE 2 Portion de cellule montrant l'incorporation de thymidine-^{3}H par les mitochondries. La plupart des grains d'argent sont sur les profils mitochondriaux. Un grain se remarque sur un cinétosome (flèche). Vacuole (*V*). Marquage de 6 heures, exposition de 5 semaines. × 17,400.

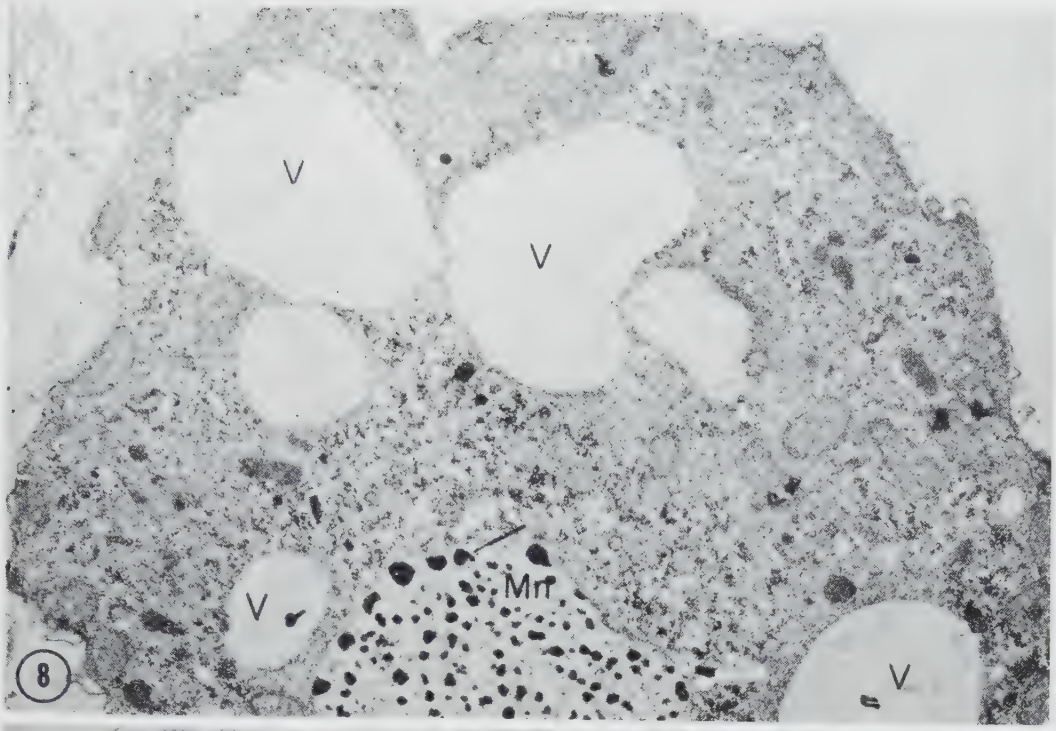




FIGURES 3–6 Intensité de la radioactivité mitochondriale par rapport au temps de marquage. Les temps de marquage sont successivement 15 minutes (Fig. 3), 1 heure (Fig. 4), 2 heures (Fig. 5), et 6 heures (Fig. 6). Exposition uniforme de 5 semaines. On voit que le nombre de mitochondries marquées par rapport au nombre total de mitochondries augmente avec le temps de marquage; on trouve 8% (Fig. 3), 11% (Fig. 4), 30% (Fig. 5), et 66% (Fig. 6). × 20,000.



FIGURES 5 et 6. — Voir légende sous Figs. 3 et 4. × 20,000.



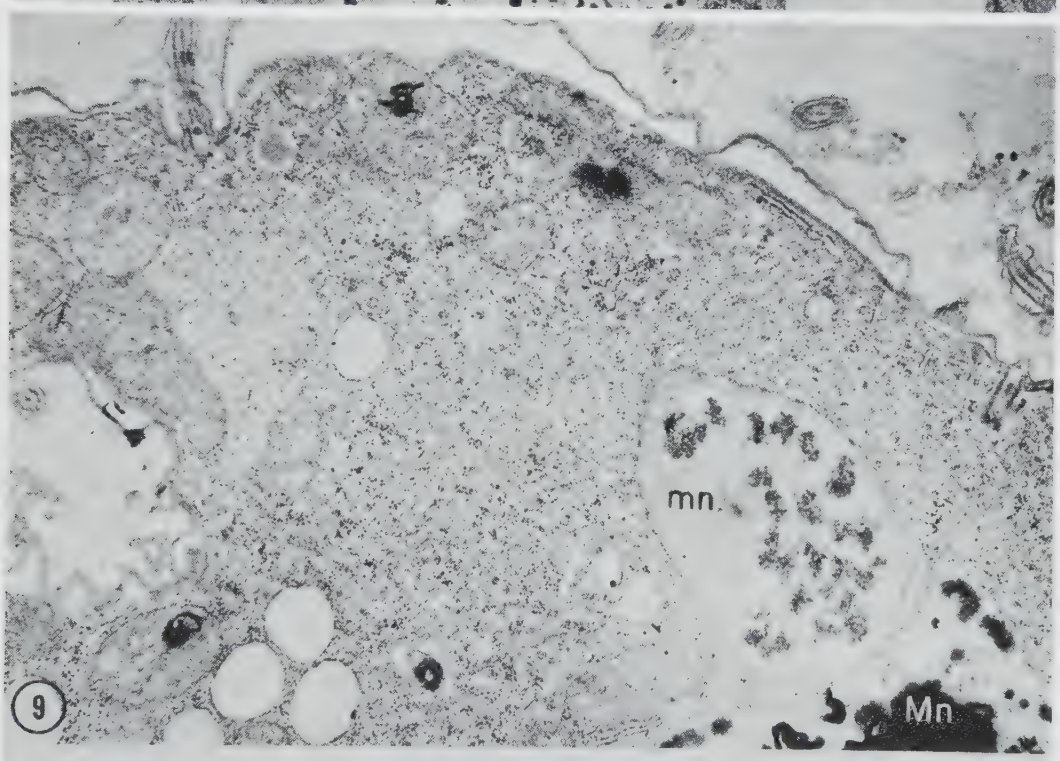


FIGURE 8 Dans cette cellule, certaines mitochondries sont marquées bien que le macronoyau (*Mn*) ne le soit pas (phase G_1 ou G_2). Vacuole (*V*). Marquage de 2 heures, exposition de 5 semaines. × 7500.

FIGURE 9 Deux mitochondries sont marquées alors que le micronoyau (*mn*) en fin de phase G_2 ne l'est pas. Le macronoyau (*Mn*) est en phase S. Marquage de 4 heures, exposition de 5 semaines. × 14,400.

J. Microscopie (1972), 14, 279-298

MODIFICATIONS DES MITOCHONDRIES ET SYNTHÈSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL DE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* APRÈS ACTION DU BROMURE D'ÉTHIDIUM *

Renée CHARRET

Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Université de Paris-Sud, 91-Orsay, France

INTRODUCTION

Le bromure d'éthidium est bien connu comme trypanosomicide. On sait qu'il agit en s'intercalant entre les paires de bases de l'ADN (Lerman, 1961 ; Elliott, 1963 ; Waring, 1965, 1966 et 1968). Steinert et coll. (1969) ont montré qu'il possède un pouvoir inhibiteur plus grand sur la synthèse de l'ADN kinétoplastique que sur celle de l'ADN nucléaire. Le processus exact de cette inhibition préférentielle n'est pas connu avec précision (voir revue de Steinert, 1971).

Riou (1967) et Steinert (1969) obtiennent des souches dyskinétoplastiques après traitement au bromure d'éthidium et Riou montre que l'ADN du kinétoplaste disparaît (1968). L'altération de l'ADN jusqu'à sa disparition, qui est fonction du temps d'action de l'inhibiteur, est étudiée par Riou et Delain (1969) au microscope électronique. Une

* Ce travail est dédié à la mémoire de M. le Pr. Fauré-Fremiet qui s'intéressait aux progrès de la Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles dont cet article fait partie. La soutenance aura lieu à la Faculté des Sciences d'Orsay.

inhibition de la synthèse de l'ADN mitochondrial est obtenue par Horwitz et Holt (1971) chez *Physarum polycephalum,* par Heilporn et Limbosch (1971), chez *Acetabularia mediterranea* (1971), par Radsak et coll. (1971) et Leibowitz (1971) chez des cellules HeLa.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae,* après action du bromure d'éthidium, Goldring et coll. (1970), ainsi que Nagley et Linnane (1970) obtiennent des souches « petites colonies » avec perte totale de l'ADN mitochondrial dans le cas d'un traitement prolongé.

En outre, la transcription est perturbée : la synthèse de l'ARN dépendant de l'ADN kinétoplastique est affectée (Steinert et coll., 1969). Chez des cellules HeLa (Zylber et coll., 1969) et chez la levure (Fukuhara et Kujawa, 1970) ont observé une inhibition sélective de la transcription de l'ADN mitochondrial. Zylber et coll. (1969) montrent que le bromure d'éthidium inhibe la synthèse des ARN 12 S et 21 S.

L'effet du bromure d'éthidium sur la structure des mitochondries, n'avait pas été étudié avant le travail de Nass (1970) sur des fibroblastes de souris. La croissance des fibroblastes est inhibée et l'inhibition s'accompagne de modifications importantes de la structure des mitochondries. Ces modifications sont retrouvées par Soslau et Nass (1971) sur des cellules L en culture, avec parallèlement une diminution de la concentration des cytochromes a-a_3, et b.

A l'exception de ceux de Horwitz et Holt (1971) tous les résultats précédents ont été obtenus sur des organismes à ADN mitochondrial circulaire. Il nous a semblé intéressant d'étudier les effets du bromure d'éthidium sur *Tetrahymena pyriformis,* cilié connu pour posséder un ADN mitochondrial linéaire (Suyama et Miura, 1968 ; Charret, 1970) et chez lequel la synthèse de l'ADN mitochondrial a été étudiée par autoradiographie (Charret et André, 1968).

L'effet de l'inhibiteur est étudié sous trois de ses aspects : 1) effet sur la croissance cellulaire, 2) effet sur les organites cellulaires et 3) effet sur la synthèse de l'ADN mitochondrial et éventuellement sur celle de l'ADN nucléaire.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Culture

Tetrahymena pyriformis, souche ST, est maintenu en culture axénique dans un milieu protéose-peptone (Difco) 1 à 2 %, enrichi par 0,25 % d'extrait de levure (Difco). Les cultures sont conservées en phase logarithmique par des repiquages quotidiens. Les courbes de croissance sont obtenues après comptage de parties aliquotes des cultures au compteur Coultronic.

Addition du bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium est ajouté au repiquage, c'est-à-dire au début de la

phase logarithmique. Les doses utilisées sont de 1,5 µg/ml et 20 µg/ml. On utilise une solution-mère à 1 mg/ml filtrée sur filtre millipore 0,45 µ juste avant l'addition au milieu de culture.

Afin de savoir si l'effet du bromure d'éthidium est réversible, les cellules traitées pendant vingt-quatre heures au moins par l'inhibiteur sont centrifugées, lavées deux fois dans un milieu dépourvu de bromure d'éthidium et remises en suspension dans du milieu frais. Des prélèvements sont alors effectués à des temps variés après la remise en culture.

Microscopie ordinaire et de fluorescence

La taille des cellules traitées est comparée à celle des témoins après examen *in vivo* au microscope. Les cellules traitées ont été examinées au microscope à fluorescence, *in vivo* et après fixation à l'acide osmique, dans le but de détecter la fluorescence du complexe ADN-bromure d'éthidium.

Microscopie électronique et autoradiographie

Les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde et à l'acide osmique après des temps d'action de l'inhibiteur variant de six à quarante-huit heures, à la dose de 20 µg/ml. Les cellules fixées sont préincluses en fibrinogène (Charret et Fauré-Fremiet, 1967) et incluses en Epon. Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle alcoolique et au citrate de plomb.

Pour l'autoradiographie, les cellules reçoivent au repiquage en même temps que l'inhibiteur, de la thymidine ^3H d'activité spécifique 25 Ci/mM (C.E.A.), à la dose de 100 µCi/ml. Les temps d'action sont de quatre heures et douze heures, de façon à rester en phase logarithmique pendant l'incorporation du précurseur (Figure 1). Les cultures témoin reçoivent la même dose de thymidine ^3H, mais pas de bromure d'éthidium. Le temps d'exposition est de quatre à cinq semaines. La technique d'autoradiographie est celle de Larra et Droz (1970).

Calcul de la surface moyenne d'une section de mitochondrie et du volume moyen d'une mitochondrie

Les surfaces sont calculées par pesée après découpage de soixante à quatre cents sections de mitochondries. De la surface totale des sections de mitochondries et de leur nombre, nous tirons la surface moyenne σ d'une section. A partir de cette surface moyenne, et assimilant chaque mitochondrie à une sphère, nous pouvons calculer le volume moyen d'une mitochondrie. La surface moyenne σ d'une section de mitochondrie n'est pas la surface du plan de coupe diamétral. Si les plans de coupe d'une mitochondrie sont répartis au hasard, la surface s du plan de coupe diamétral répond à la relation $s = \frac{3}{2}\sigma$. Le volume moyen d'une mitochondrie sphérique ayant un grand cercle de surface s est alors $V = \sqrt{\frac{6\sigma^3}{\pi}}$

Calcul du volume du chondriome

Si C est la surface occupée par les sections de mitochondries par unité de surface de cytoplasme, le volume occupé par le chondriome par unité de volume de cytoplasme est donné avec une approximation suffisante pour des mesures comparatives par $V = C^{3/2}$. Des précédents calculs on peut tirer le nombre des mitochondries pour un certain volume de cytoplasme.

Le fait d'assimiler chaque mitochondrie à une sphère alors que certaines

coupes suggèrent plutôt des mitochondries ellipsoïdales, nous fait commettre une erreur sur le volume moyen des mitochondries. Malgré cette erreur, nous nous contenterons de cette estimation pour établir des comparaisons entre le volume du chondriome de cellules non traitées et celui de cellules traitées.

Calcul des concentrations des radioactivités mitochondriale et nucléaire

A partir de la surface moyenne d'une section de mitochondrie ou de noyau et du nombre de sections sur lesquelles les grains d'argent ont été comptés, nous avons calculé le nombre moyen de grains d'argent pour 100 μ^2 de mitochondrie ou de noyau. Pour les mitochondries, seuls ont été comptés les grains situés sur un profil mitochondrial ou à moins de 0,1 μ de la membrane.

RÉSULTATS

I. *Influence du bromure d'éthidium sur les cellules*

1. Temps de génération

La Figure 1 montre les courbes de croissance d'une culture de *Tetrahymena pyriformis* ST cultivée en présence de bromure d'éthidium aux doses de 1,5 μg/ml et de 20 μg/ml, ainsi que celle d'une culture témoin.

La dose de 20 μg/ml ajoutée lors du repiquage, c'est-à-dire au début de la phase de croissance logarithmique, provoque un ralentissement considérable dans le développement de la culture. Le temps de génération qui est de trois heures pour le témoin passe à douze heures et la phase stationnaire est atteinte en quatorze heures au lieu de trente-six heures. La dose de 1,5 μg/ml ralentit également la croissance mais à un degré moindre.

2. Résistance à l'inhibiteur et taille des cellules

Quoique la phase stationnaire soit atteinte au bout de quatorze heures après addition de 20 μg/ml de bromure d'éthidium, on peut prolonger l'action au-delà de quarante-huit heures sans provoquer la mort des cellules. Des cellules traitées pendant vingt-quatre heures avec cette dose ne montrent pas de différence notable de taille. Elles sont cependant plus arrondies que les cellules normales ; leur nage est aussi rapide que celle des témoins. On observe encore quelques divisions.

3. Réversibilité

Après un traitement de vingt-quatre heures les cellules remises en suspension en milieu sans bromure d'éthidium reprennent une croissance normale.

II. *Structure des cellules traitées*

De tous les organites, seules les mitochondries présentent des modifications importantes. Le noyau (Pl. I, fig. *b* et Pl. II, fig. *a* et *b*) est apparemment semblable à celui des cellules témoin (Pl. I, fig. *a*). Les modifications

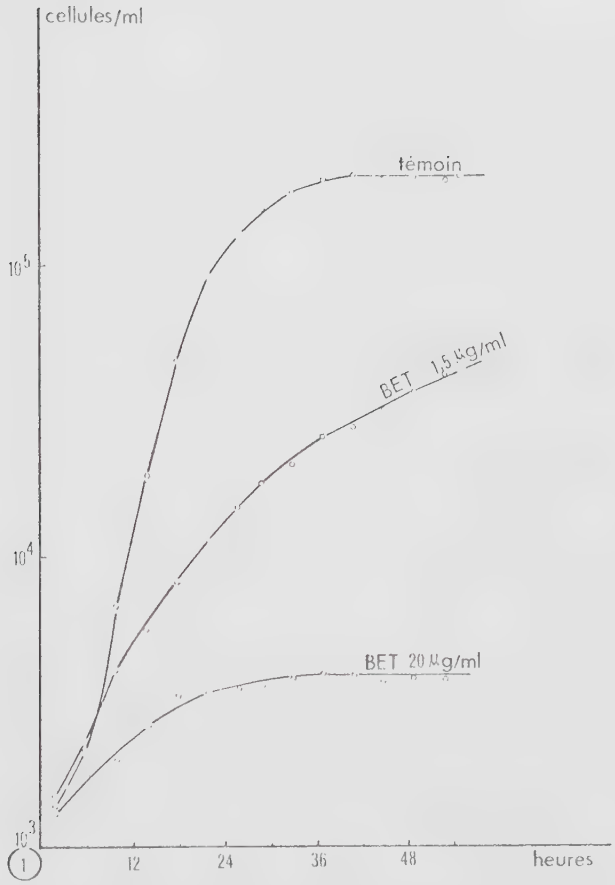


FIGURE 1. Courbes de croissance d'une culture témoin et de deux cultures traitées, l'une avec 1,5 µg/ml de bromure d'éthidium, l'autre avec 20 µg/ml.

mitochondriales concernent le nombre, la taille et la structure des mitochondries, ainsi que le volume du chondriome ; elles sont les mêmes pour vingt-quatre heures, que la dose soit de 20 µg/ml ou de 1,5 µg/ml (Pl. III, fig. *a* et *b*) et semblent plus en rapport avec le temps d'action du bromure d'éthidium qu'avec la dose utilisée.

Par comparaison avec la Planche IV, fig. *a* qui présente une mitochondrie de cellule non traitée, sur laquelle les ribosomes mitochondriaux sont visibles, la Planche I, fig. *b* et la Planche II, fig. *a* et *b* montrent l'évolution de l'effet de l'inhibiteur sur la structure des mitochondries en fonction du temps (respectivement quatre heures, douze heures et vingt-quatre heures). Après quatre heures, les mitochondries sont plus petites (Tableau I) et elles ont quitté la position périphérique qu'on

TABLEAU I. — *Surface moyenne d'une section de mitochondrie, volume moyen d'une mitochondrie et nombre de mitochondries par 1000 μ^3 de cytoplasme*

	TÉMOIN	BROMURE D'ÉTHIDIUM				
		1 heure	2 heures	4 heures	12 heures	24 heures
Nombre de sections de mitochondries découpées	261	125	117	61	147	395
Surface occupée par les sections de mitochondries en μ^2	196,14	84,03	58,04	19,96	33,49	56,76
Surface totale du cytoplasme correspondant en μ^2	1 110,67	382,06	337,01	137,23	298,91	252,83
Surface moyenne d'une section de mitochondrie σ en μ^2	0,75	0,67	0,49	0,32	0,22	0,14
Volume moyen d'une mitochondrie $V = \sqrt{\frac{6\sigma^3}{\pi}} (\mu^3)$	0,8978	0,7581	0,4741	0,2583	0,1503	0,0723
Volume occupé par les mitochondries par 1 000 μ^3 de cytoplasme	74,21	103,12	71,45	55,47	37,49	106,32
Nombre de mitochondries par 1 000 μ^3 de cytoplasme	83	137	152	214	249	1 470

leur connaît (Pl. I, fig. *a*) dans des cellules en phase logarithmique de croissance normale (Elliott et coll., 1966 ; Charret et André, 1968) ; elles possèdent encore de nombreuses crêtes. A partir de six heures et jusqu'à vingt-quatre heures, les modifications des mitochondries s'accentuent : leur taille diminue tandis que leur nombre augmente (Tableau I) leurs crêtes se raréfient et deviennent quelquefois boursouflées (Pl. II, fig. *a* et *b*). La matrice renferme un matériel réticulé et les ribosomes mitochondriaux sont devenus très rares (Pl. IV, fig. *b*).

1. Surface moyenne d'une mitochondrie

On trouve dans le Tableau I le nombre de sections de mitochondries et leur surface après les différents temps d'action du bromure d'éthidium ; la Figure 2 indique l'évolution de la surface moyenne des sections de

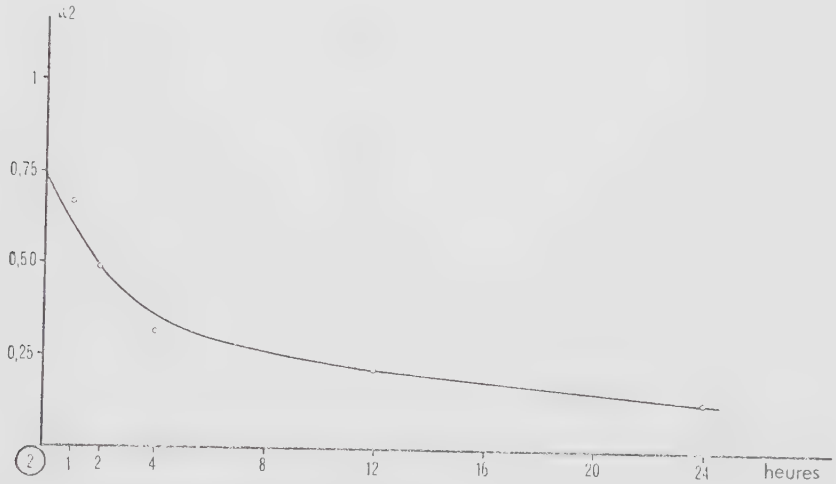


FIGURE 2. Représentation graphique de la diminution de la surface moyenne d'une section de mitochondrie en fonction du temps d'action du bromure d'éthidium.

mitochondries calculée à partir des données ci-dessus, en fonction du temps d'action de l'inhibiteur. La surface moyenne d'une section de mitochondrie de cellule en phase logarithmique (témoin) est prise comme référence. La courbe est fortement décroissante dès les premières heures du traitement puis continue de décroître plus lentement jusqu'à vingt-quatre heures.

2. Volume du chondriome, volume moyen d'une mitochondrie et nombre de mitochondries

Les résultats sont rapportés sur le Tableau I et la Figure 3 indique l'évolution du volume occupé par le chondriome et celle du nombre de

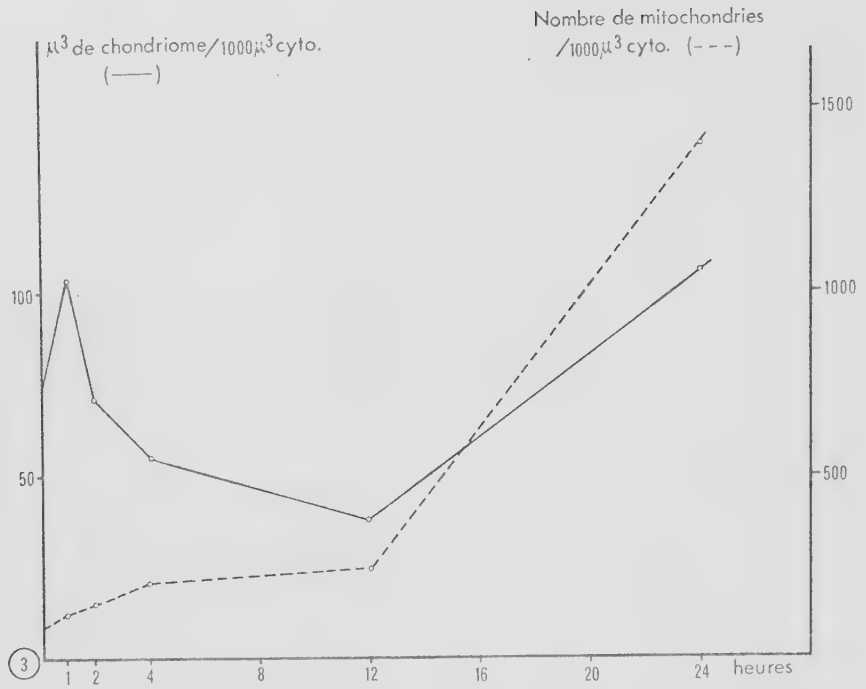


FIGURE 3. Représentation graphique des modifications du nombre de mitochondries et du volume du chondriome par 1 000 μ^3 de cytoplasme en fonction du temps d'action du bromure d'éthidium.

mitochondries par 1 000 μ^3 de cytoplasme en fonction du temps d'action du bromure d'éthidium. Au cours de la première heure, le volume du chondriome augmente, puis il diminue jusqu'à douze heures et augmente de nouveau dans la seconde moitié de l'expérience jusqu'à être légèrement supérieur à celui du témoin. Le nombre de mitochondries augmente tout au long de l'expérience. Il est, par unité de volume de cytoplasme, environ vingt fois plus grand après vingt-quatre heures de traitement au bromure d'éthidium que dans les cellules de la culture témoin.

III. *Effet du bromure d'éthidium sur l'ADN mitochondrial*

1. Microscopie de fluorescence

Cellules vivantes

Des cellules traitées au bromure d'éthidium à la dose de 20 μg/ml au début de la phase logarithmique pendant deux heures ne montrent, observées *in vivo,* aucune fluorescence macronucléaire, au moins au début de l'observation ; par contre, elles montrent une fluorescence des mitochondries. En prolongeant l'observation *in vivo,* on voit apparaître

TABLEAU II. — *Intensité du marquage des mitochondries exprimée en pourcentage de mitochondries radioactives, et concentration de radioactivité exprimée en grains d'argent par 100 μ² de surface mitochondriale.*

	TÉMOIN					BROMURE D'ÉTHIDIUM 20 μg/ml	
Temps	30 minutes	1 heure	2 heures	4 heures	12 heures	4 heures	12 heures
Nombre de mitochondries radioactives	43	85	95	240	325	39	67
Nombre total de mitochondries	300	608	310	534	631	1 271	2 029
Pourcentage de mitochondries radioactives et écart-type	14,3 ± 2,0	13,9 ± 1,4	30,6 ± 2,6	44,9 ± 2,1	51,5 ± 1,9	3,01 ± 0,45	3,3 ± 0,35
Concentration en radioactivité. Nombre de grains/100 μ²	22,7 ± 3,2	23,24 ± 2,2	60,21 ± 5,0	80,64 ± 4,4	109,66 ± 4,7	9,8 ± 1,5	15,3 ± 1,8

progressivement la fluorescence dans le noyau, parallèlement avec des modifications du comportement de la cellule, ralentissement des battements ciliaires, puis immobilité qui prélude à la mort de la cellule. Les conditions imposées par l'examen en fluorescence sont difficilement compatibles avec une survie prolongée.

Cellules fixées

Sur des cellules préalablement fixées aux vapeurs de tétroxide d'osmium, la fluorescence du noyau apparaît, même après des temps courts de traitement au bromure d'éthidium (quinze minutes) et le cytoplasme se colore uniformément.

2. Incorporation de thymidine ^3H dans les cellules traitées

Incorporation dans le noyau

Les noyaux des cellules témoin sont tous très radioactifs après quatre heures et douze heures de marquage à la thymidine tritiée. Dans les

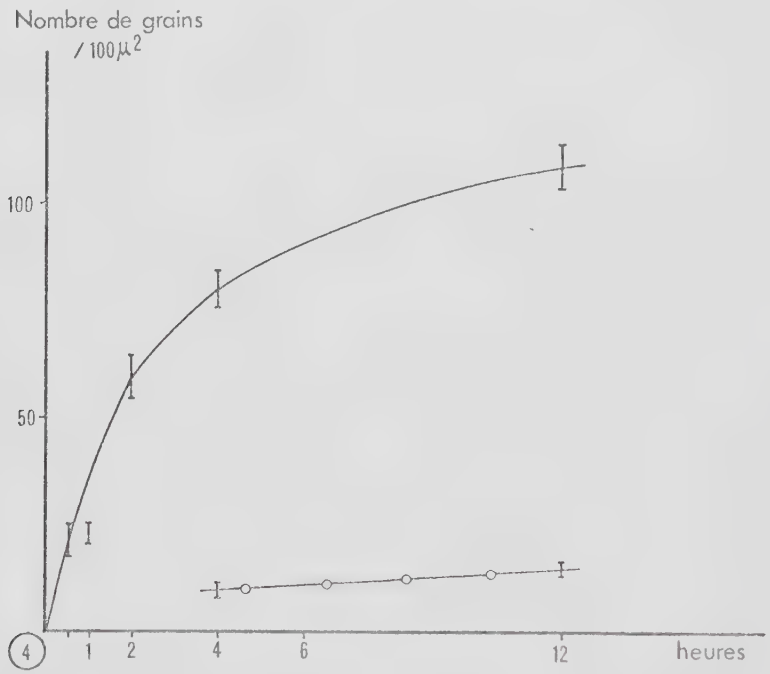


FIGURE 4. Représentation graphique de la concentration de la radioactivité exprimée en nombre de grains d'argent par 100 μ^2 de cytoplasme en fonction du temps.

Culture témoin ————

Culture traitée avec 20 μg/ml de bromure d'éthidium —o—o—o—

cellules traitées, les noyaux sont également très marqués et on ne trouve pas, même dans les cellules traitées pendant quatre heures avec le bromure d'éthidium, de noyaux pas ou faiblement marqués.

Afin de comparer les radioactivités nucléaires chez les témoins et chez les cellules traitées quatre heures, nous avons réduit le temps d'exposition des autoradiographies à dix jours. Dans ce cas, la concentration en radioactivité des noyaux des cellules normales (482 grains/ 100 μ^2) est semblable à celle des noyaux des cellules traitées (490 grains/ 100 μ^2). Ce résultat montre qu'il n'y a pas d'inhibition de synthèse de l'ADN nucléaire par un traitement de quatre heures au bromure d'éthidium à la dose de 20 µg/ml.

Incorporation dans les mitochondries

L'incorporation de thymidine tritiée dans les mitochondries de cellules traitées (Pl. V, fig. *a* et Pl. VI, fig. *a*) est nettement inférieure à ce que l'on observe dans les témoins (Pl. V, fig. *b* et Pl. VI, fig. *b*). Les concentrations de radioactivité exprimées en nombre de grains par 100 μ^2 de mitochondries sont rapportées sur le Tableau II et la Figure 4. Ces résultats indiquent que l'addition du bromure d'éthidium entraîne une inhibition de plus de 85 % de la synthèse de l'ADN mitochondrial (Tableau III). Si la concentration de radioactivité des cellules traitées à douze heures est faible, elle est néanmoins supérieure à la concentration observée à quatre heures.

TABLEAU III. — *Comparaison des concentrations en radioactivité mitochondriale après quatre heures et douze heures de marquage chez le témoin et chez les cellules traitées. Pourcentage d'inhibition*

TEMPS	CONCENTRATION EN RADIOACTIVITÉ témoin	CONCENTRATION EN RADIOACTIVITÉ + BET 20 µg/ml	INHIBITION %
4 heures	80,6 ± 4,4	9,8 ± 1,5	87,85
12 heures	109,6 ± 4,7	15,3 ± 1,8	86,05

DISCUSSION

La microscopie en fluorescence semble apporter la preuve que le bromure d'éthidium à la dose que nous utilisons ne se lie pas de façon sensible à l'ADN nucléaire. Par contre, la nette fluorescence des mitochondries

indique que le colorant pénètre effectivement dans ces dernières et se complexe probablement à l'ADN.

L'allongement du temps de génération de *Tetrahymena pyriformis* après addition de bromure d'éthidium est un phénomène très semblable à celui que l'on connaît chez *Crithidia luciliae* (Steinert, 1969). Les effets sur la croissance cellulaire varient avec les organismes. L'inhibition totale de la multiplication cellulaire chez *Crithidia luciliae* est provoquée par 200 µg/ml alors que 1 µg/ml suffit pour provoquer un arrêt de la croissance des fibroblastes de souris (Nass, 1970). De même, la réversibilité de l'effet est différente ; *Tetrahymena pyriformis* traitée pendant vingt-quatre heures par 20 µg/ml de bromure d'éthidium retrouve une croissance normale après élimination de l'inhibiteur et, si les fibroblastes de souris supportent 1 µg/ml pendant soixante-douze heures, une dose de 5 µg/ml a un effet tout à fait irréversible (Nass, 1970).

Le ralentissement de la croissance observé chez *Tetrahymena pyriformis* peut s'expliquer par une action du bromure d'éthidium sur les divisions cellulaires. Risueno et coll. (1971) ont obtenu un blocage des divisions, en traitant des méristèmes radiculaires d'*Allium cepa* par le bromure d'éthidium à la dose de 0,1 %, ce qui représente cinquante fois la dose que nous utilisons chez *Tetrahymena* (20 µg/ml). Ces auteurs n'ont pas cherché à savoir si pour une telle dose, l'inhibiteur se liait ou non à l'ADN nucléaire.

1. *Structure des cellules traitées*

Les modifications apportées par un traitement au bromure d'éthidium concernent essentiellement les mitochondries et se font sentir assez rapidement. Dès quatre heures, les mitochondries ont quitté leur position périphérique (Elliott et coll., 1966 ; Charret et André, 1968) et se trouvent réparties au sein du cytoplasme, comme dans une cellule en phase stationnaire.

Le bromure d'éthidium provoque une raréfaction progressive des crêtes, qui se manifeste après six heures de traitement. La matrice, peu importante dans les mitochondries de cellules normales, est abondante et d'aspect réticulé dans les mitochondries de cellules traitées ; de plus, on ne retrouve presque pas de ribosomes mitochondriaux.

Le nombre et la taille des mitochondries étant considérablement modifiés, il était intéressant de savoir comment varie le volume du chondriome pour un volume donné de cytoplasme. Le nombre de mitochondries pour 1 000 μ^3 de cytoplasme augmente progressivement avec le temps. Après douze heures de traitement il est multiplé par un facteur quatre, à la fin de l'expérience par un facteur vingt ; le volume du chondriome varie lui aussi avec le temps. Au cours des douze premières heures, pendant lesquelles les cellules subissent au moins une

division cellulaire, le nombre de mitochondries augmente, alors que le volume du chondriome diminue de moitié, ce qui indique une division des mitochondries, les mitochondries filles étant restées de taille plus faible. Par contre, en phase stationnaire, lorsque les divisions cellulaires sont à peu près nulles, il y a une division accrue des mitochondries ; elle s'accompagne alors d'une légère augmentation de volume de l'ensemble du chondriome. Au cours de la première heure, l'augmentation du volume du chondriome est probablement due au fait que l'effet de l'inhibiteur ne se manifeste qu'avec une certaine latence.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux qu'observent Turner et Lloyd (1970) sur *Tetrahymena pyriformis* ST, après un traitement au chloramphénicol, qui entraîne contrairement à ce que nous observons avec le bromure d'éthidium, une diminution de taille des cellules, mais provoque aussi la formation de mitochondries plus petites et plus nombreuses.

Avec une dose de bromure d'éthidium identique à celle que nous utilisons, Meyer et coll. (1972) observent chez *Tetrahymena pyriformis*, souche W, 100 % de cellules anormales avec disparition des mitochondries. C'est une dose cinq fois moins élevée que la nôtre qui provoque les modifications que nous décrivons. La différence dans l'effet de l'inhibiteur est probablement due à un caractère inhérent à la souche, ou aux conditions de culture.

2. *Influence du bromure d'éthidium sur la synthèse d'ADN*

a. ADN nucléaire

Tous les noyaux, que ce soient ceux des cellules témoin, comme ceux des cellules traitées, sont fortement marqués. Dans les témoins, après quatre heures de marquage, la durée d'une génération cellulaire étant de trois heures, on est sûr que tous les noyaux ont effectué un cycle mitotique complet. Par contre, dans les cellules traitées, le temps de génération a augmenté. Si les différentes phases G1, S et G2 du noyau s'allongeaient de façon homologue, nous devrions trouver un certain pourcentage de noyaux faiblement marqués ou non marqués. Or, tous sont très radioactifs ; ce fait montre que le bromure d'éthidium n'allonge pas de façon notable les phases G1, ni S. Il montre aussi qu'une cellule frappée en G2 reste capable de se diviser et d'entamer un nouveau cycle réplicatif comprenant la phase S. Par contre, c'est la phase G2 qui se trouve considérablement allongée puisque d'emblée le temps de doublement passe de trois heures à douze heures.

b. ADN mitochondrial

Après traitement au bromure d'éthidium, il apparaît une inhibition d'environ 85 % de la synthèse de l'ADN mitochondrial. La concentration en radioactivité est supérieure à celle notée après quatre heures, ce qui

indique une faible synthèse d'ADN au cours de cette période. Les concentrations notées dans les cellules traitées sont celles que l'on observe après des temps de marquage courts, inférieurs à trente minutes, dans une culture normale en phase logarithmique, où l'on sait que la synthèse de l'ADN mitochondrial est continue au cours du cycle cellulaire (Charret et André, 1968). Cette observation laisserait supposer que durant ces trente minutes, quelques mitochondries seulement seraient capables d'incorporer de la thymidine dans leur ADN ; les réplications en cours dans certaines mitochondries se poursuivraient alors que l'initiation de la synthèse dans la plupart des mitochondries serait bloquée par le bromure d'éthidium. La modification de la molécule d'ADN par le bromure d'éthidium peut aussi entraîner un fonctionnement défectueux de l'ADN-polymérase, sans que la synthèse de l'ADN soit bloquée totalement.

L'inhibition de synthèse obtenue chez *Tetrahymena pyriformis* est du même ordre que celle observée par Steinert et coll. (1969) chez *Crithidia luciliae,* par Horwitz et Holt (1971) chez *Physarum polycephalum,* et Radsak et coll. (1971) chez des cellules HeLa. Des organismes cités ci-dessus, les uns ont un ADN mitochondrial circulaire, les autres sont connus pour posséder un ADN mitochondrial linéaire. Tous ces ADN sont sensibles au bromure d'éthidium, qu'il s'agisse de molécules circulaires ou de molécules linéaires.

La diminution de la radioactivité d'origine mitochondriale, après marquage à la thymidine ^3H, indique bien que le bromure d'éthidium agit essentiellement sur la synthèse de l'ADN mitochondrial. L'ADN-polymérase ne sait pas copier ou copie mal une molécule modifiée telle que l'est celle de l'ADN par le colorant.

D'après Meyer et Simpson (1968), Kalf et Ch'ih (1968), Iwashima et Rabinowitz (1969), Wintersberger et Wintersberger (1970), on sait que les ADN-polymérases mitochondriale et nucléaire sont différentes. Meyer et Simpson (1969), après avoir isolé ces enzymes montrent que, *in vitro,* le bromure d'éthidium inhibe plus fortement les réactions catalysées par l'ADN polymérase nucléaire.

A cette inhibition fait suite une transcription défectueuse que Steinert et coll. (1969) observent chez *Crithidia,* Sylber et coll. (1970) chez des cellules HeLa et Fukuhara et Kujawa (1970) chez la levure normale. Des expériences d'hybridation ont montré que l'ARN des ribosomes mitochondriaux est codé par l'ADN mitochondrial (voir revue de Borst et Grivell, 1971). D'après Sylber et coll. (1970), la synthèse des ARN 12 S et 21 S est inhibée par le traitement au bromure d'éthidium chez des cellules HeLa. Dans nos expériences, la disparition des ribosomes mitochondriaux des cellules traitées peut être considérée comme le fait d'une transcription défectueuse.

Il est alors logique de penser que la traduction risque elle-même d'être perturbée. Nos résultats indiquent qu'il y a des modifications

importantes dans la structure des mitochondries, modifications qui affectent plus la membrane interne et les crêtes, que la membrane externe. Ceci s'accorde avec les observations de Nass (1970) chez des fibroblastes de souris, avec celles de Soslau et Nass (1971) chez des cellules L en culture et avec celles de Lenk et Penman (1971) chez des cellules HeLa. Il semble que les mitochondries ne soient plus capables d'assurer la totalité de leur équipement en crêtes, ce qui est en accord avec l'idée que l'ADN mitochondrial participe à la synthèse d'au moins une ou quelques-unes des protéines mitochondriales qui conditionnent l'édification de la membrane interne. Cette participation peut se faire selon plusieurs modalités, soit par synthèse de certaines protéines de la membrane interne, soit par synthèse d'une protéine à fonction d'intégration et de régulation qui contrôlerait l'élaboration de la membrane interne et des crêtes, selon les conceptions de Mahler et coll. (1971).

L'inhibition de la synthèse de l'ADN mitochondrial par le bromure d'éthidium et, celle des ARN ribosomaux qui lui fait suite se traduisent, pour les mitochondries, par une diminution de la surface de la membrane interne. Ceci est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse selon laquelle la synthèse de certaines protéines de la membrane interne et des crêtes, ou celle d'une ou des enzymes indispensables à leur assemblage, est sous la dépendance de l'ADN et des ribosomes mitochondriaux.

Remerciements

Nous tenons à remercier Michel Charlier du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans pour son aide dans les calculs des surfaces et des volumes des mitochondries.

Une partie de ce travail a été réalisée avec l'aide technique de Claudette Roux.

Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle du C.N.R.S. (E.R.A. 174), de la D.R.M.E. (contrat 70/414) et du C.E.A. (participation à l'achat de molécules marquées).

RÉSUMÉ

Le bromure d'éthidium est connu pour se lier spécifiquement à l'ADN mitochondrial. Son effet est étudié sur des cultures de *Tetrahymena pyriformis* en phase logarithmique.

A la dose de 20 µg/ml, le temps de génération s'allonge considérablement avec une atteinte rapide de la phase stationnaire. Le ralentissement de la croissance s'accompagne de modifications importantes des mitochondries ; ces modifications sont fonction du temps d'action du colorant ; elles se manifestent très tôt par une diminution de la taille des mitochondries, puis plus tard, par une raréfaction des crêtes avec, parallèlement, une augmentation du nombre des mitochondries. Les ribosomes mitochondriaux deviennent très rares.

La synthèse de l'ADN mitochondrial est étudiée par autoradiographie au microscopie électronique après marquage à la thymidine-^{3}H. Le bromure d'éthidium inhibe à 85 % la synthèse de l'ADN mitochondrial alors que celle de l'ADN nucléaire ne semble pas affectée.

Ces diverses observations amènent à conclure que, bien que la capacité d'information contenue dans l'ADN mitochondrial soit faible, cet ADN participe à l'élaboration de la membrane interne, en contrôlant, soit la synthèse d'une protéine membranaire, soit celle d'une protéine de régulation et d'intégration responsable de la mise en place des protéines de la membrane interne et des crêtes.

SUMMARY

Ethidium bromide is known to bind specifically to mitochondrial DNA. Its effect is studied in logarithmic phase cultures of *Tetrahymena pyriformis*.

At a concentration of 20 μg/ml, the generation time is considerably lengthened and the stationary phase is more rapidly attained. Important mitochondrial modifications accompany the slower growth, as a function of the time of action of the drug. An early effect is a decrease in the mitochondrial mass ; later, a loss of cristae and a parallel increase in the number of mitochondria are observed. The mitochondrial ribosomes become rare.

Electron microscopic autoradiography was used to study DNA synthesis after labeling with ^{3}H thymidine. The drug inhibits mitochondrial DNA synthesis up to 85 % but does not appear to affect nuclear DNA synthesis.

The mitochondrial modifications, characterized by a loss of cristae and ribosomes, along with an inhibition of DNA synthesis, point to a role of mitochondrial DNA in mitochondrial biogenesis. It is suggested that, in spite of the low capacity of information in mitochondrial DNA, it takes part in inner membrane growth by control of the synthesis of either a protein of the membrane or a regulatory and integrating protein, responsible for the building of the inner membrane and cristae.

BIBLIOGRAPHIE

1. Borst P. et Grivell L.A., 1971. Mitochondrial ribosomes. *FEBS Letters*, 13, 73-88.
2. Charret R., 1970. L'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis* : forme et taille des molécules. 7^e *Congr. Intern. Micr. Electr.*, 1970, Grenoble. Favard P., éd., Soc. Fr. Micr. Electr., Paris, III, 161-162.
3. Charret R. et André J., 1968. La synthèse de l'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis*. Etude radioautographique quantitative au microscope électronique. *J. Cell Biol.*, 39, 369-381.
4. Charret R. et Fauré-Fremiet E., 1967. Technique de rassemblement de microorganismes : préinclusion dans un caillot de fibrine. *J. Microscopie*, 6, 1063-1066.
5. Delain E. et Riou G., 1969. Ultrastructure des altérations du DNA du kinétoplaste de *Trypanosoma cruzi* traité par le bromure d'éthidium. *C.R. Acad. Sc.*, 268, 1327-1330.

6. Elliott A.M., Travis D.M. and Work J.A., 1966. An ultrastructural study of the effects of aeration and physical activity on aging in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Exp. Zool.*, 161, 177-192.
7. Elliott W.H., 1963. The effects of antimicrobial agents on deoxyribonucleic acid polymerase. *Biochem. J.*, 86, 562-567.
8. Fukuhara H. and Kujawa C., 1970. Selective inhibition of the *in vivo* transcription of mitochondrial DNA by ethidium bromide and by acriflavin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 41, 1002-1008.
9. Goldring E.S., Grossman L.I., Krupnick D., Cryer D.R. and Marmur J., 1970. The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J. Mol. Biol.*, 52, 323-335.
10. Heilporn V. et Limbosch S., 1971. Les effets du bromure d'éthidium sur *Acetabularia mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta*, 240, 94-108.
11. Horwitz H.B. and Holt C.E., 1971. Specific inhibition by ethidium bromide of mitochondrial DNA synthesis in *Physarum polycephalum*. *J. Cell Biol.*, 49, 546-553.
12. Iwashima A. and Rabinowitz M., 1969. Partial purification of mitochondrial and supernatant DNA polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 283-293.
13. Kalf G.F. and Ch'ih J.J., 1968. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 243, 4904-4916.
14. Larra F. et Droz B., 1970. Techniques radioautographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. *J. Microscopie*, 9, 845-880.
15. Leibowitz R.D., 1971. The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 51, 116-122.
16. Lenk R. et Penman S., 1971. Morphological studies of cells grown in the absence of mitochondrial-specific protein synthesis. *J. Cell Biol.*, 49, 541-546.
17. Lerman L.S., 1961. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.*, 3, 18-30.
18. Mahler H.R., Perlman P.S. and Mehrotra B.D., 1971. Mitochondrial specification of the respiratory chain. In : *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*. Boardman N.K., Linnane A.W. et Smillie R.M., éd., North Holland Publ. Co., Amsterdam, 492-511.
19. Meyer R.R., Boyd C.R., Rein D.C. and Keller S.J., 1972. Effects of ethidium bromide on growth and morphology of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.*, 70, 233-236.
20. Meyer R.R. and Simpson M.V., 1968. DNA biosynthesis in mitochondria : partial purification of a distinct DNA polymerase from isolated rat liver mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 61, 130-137.
21. Meyer R.R. and Simpson M.V., 1969. DNA biosynthesis in mitochondria : Differential inhibition of mitochondrial and nuclear DNA polymerases by the mutagenic dyes ethidium bromide and acriflavin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 34, 238-244.
22. Nagley P. and Linnane A.W., 1970. Mitochondrial DNA déficient petite mutants of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 39, 989-996.

23. Nass M.M.K., 1970. Abnormal DNA patterns in animal mitochondria : ethidium bromide-induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **67**, 1926-1933.

24. Radsak K., Kato K., Sato N. and Koprowski H., 1971. Effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA and cytochrome synthesis in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, **66**, 410-416.

25. Riou G., 1967. Induction d'une « dyskinétoplastie » par le bromure d'éthidium chez *Trypanosoma cruzi* cultivé *in vitro*. *C.R. Acad. Sc.*, **265**, 2004-2007.

26. Riou G., 1968. Disparition de l'ADN du kinétoplaste de *Trypanosoma cruzi* cultivé en présence de bromure d'éthidium. *C.R. Acad Sc.*, **266**, 250-252.

27. Riou G. and Delain E., 1969. Abnormal circular DNA molecules induced by ethidium bromide in the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **64**, 618-625.

28. Risueno M.C., Gimenez-Martin G. and Gonzalez-Fernandez A., 1971. Ultrastructural analysis of cytokinesis in plant cells blocked at prophase. *J. Microscopie*, **10**, 331-336.

29. Snyder A.L., Kann H.E. Jr, and Kohn K.W., 1971. Inhibition of the processing of ribosomal precursor RNA by intercalating agents. *J. Mol. Biol.*, **58**, 555-565.

30. Soslau G. and Nass M.M.K., 1971. Effects of ethidium bromide on the cytochrome content and ultrastructure of L cell mitochondria. *J. Cell Biol.*, **51**, 514-524.

31. Steinert M., 1969. Specific loss of kinetoplastic DNA in *Trypanosomatidae* treated with ethidium bromide. *Exp. Cell Res.*, **55**, 248-252.

32. Steinert M., 1971. Effects of pharmacological agents on mitochondrial and kinetoplastic DNA. *Advances in cytopharmacology*, **1**, First international symposium on cell biology and cytopharmacology, Raven press, New York, 229-240.

33. Steinert M., Van Assel S. et Steinert G., 1969. Etude, par autoradiographie, des effets du bromure d'éthidium sur la synthèse des acides nucléiques de *Crithidia luciliae*. *Exp. Cell Res.*, **55**, 69-74.

34. Suyama Y. and Miura K., 1968. Size and structural variations of mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **60**, 235-242.

35. Turner G. and Lloyd D., 1969. The effect of growth with chloramphenicol on the mitochondria of *Tetrahymena pyriformis* Strain ST. *Biochem. J.*, **116**, 41 p.

36. Waring M.J., 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 269-282.

37. Waring M.J., 1966. Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 234-244.

38. Waring M.J., 1968. Drugs which affect the structure and function of DNA. *Nature*, **219**, 1320-1325.

39. Wintersberger U. and Wintersberger E., 1970*a*. Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from Yeast. 1. Partial purification and properties of two DNA polymerases from mitochondria-free cell extracts. *Eur. J. Biochem.*, **13**, 11-19.

40. WINTERSBERGER U. and WINTERSBERGER E., 1970*b*. Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from Yeast. 2. Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from wild type and respiration-deficient Yeast cells. *Eur. J. Biochem.*, **13**, 20-27.

41. ZYLBER E., VESCO C. and PENMAN S., 1969. Selective inhibition of the synthesis of mitochondria-associated RNA by ethidium bromide. *J. Mol. Biol.*, **44**, 195-204.

Manuscrit reçu le 24 janvier 1972.

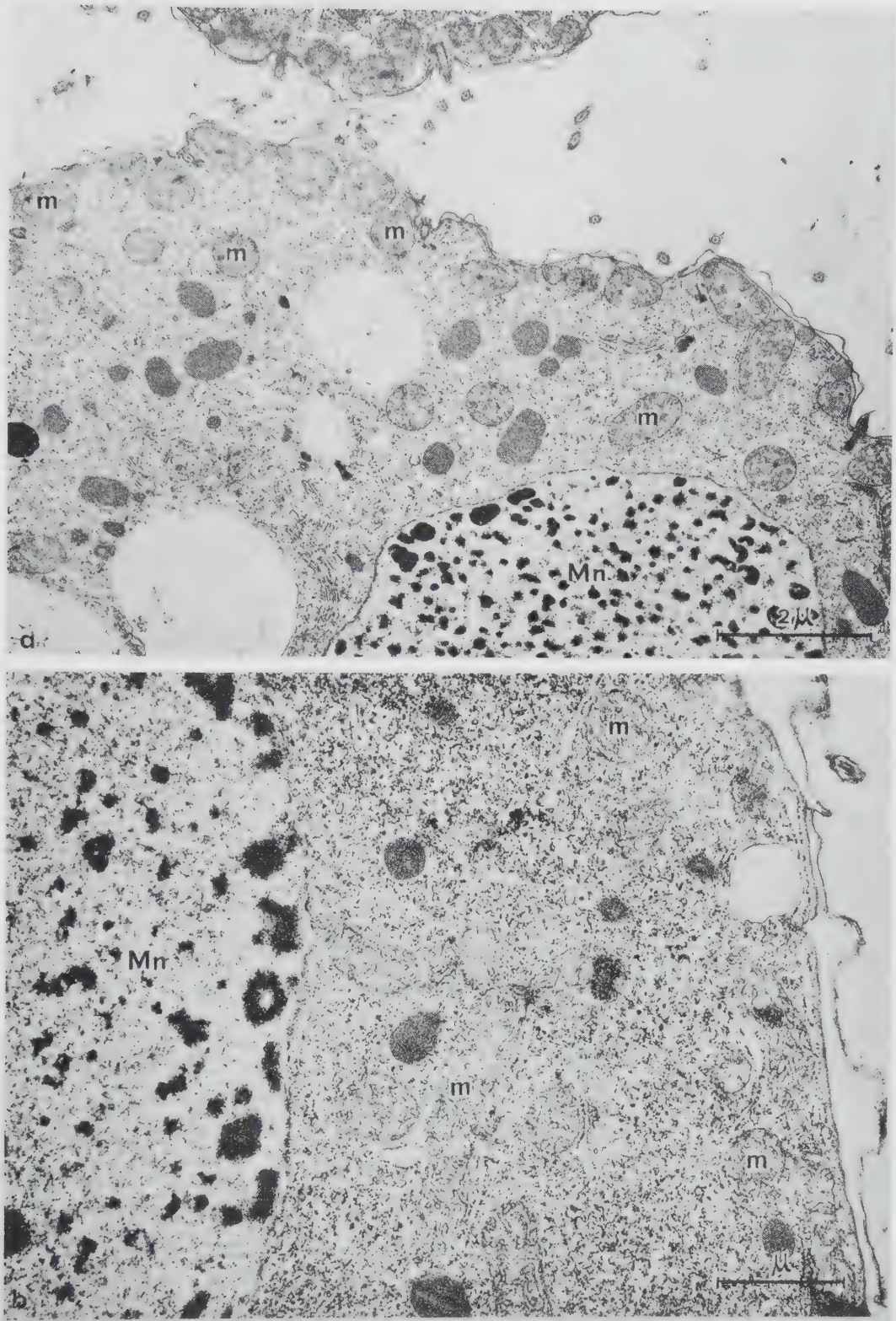
Accepté pour publication le 12 avril 1972.

Journal de Microscopie, Volume 14, 1972

Planche I

Fig. a. — Portion de cytoplasme de cellule d'une culture témoin en phase logarithmique, montrant les mitochondries (*m*) normales et le macronoyau (*Mn*); × 12 000.

Fig. b. — Portion de cytoplasme de cellule traitée avec 20 µg/ml de bromure d'éthidium pendant quatre heures. Le macronoyau (*Mn*) semble identique à celui de la cellule non traitée de la figure *a*. Les mitochondries (*m*) ne sont pas modifiées ; × 20 000.

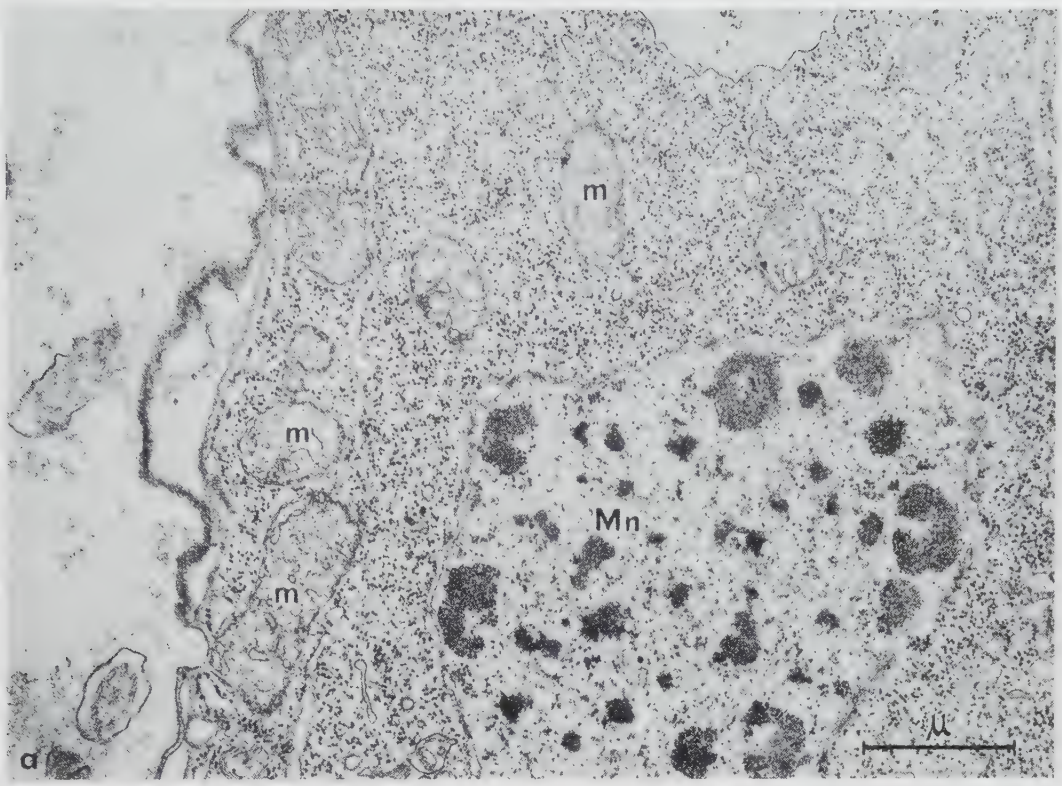


JOURNAL DE MICROSCOPIE
R. Charret

Planche

Planche II

Fig. a et *b*. — Portions de cytoplasme de cellules traitées avec 20 µg/ml de bromure d'éthidium pendant douze heures (fig. *a*) et vingt-quatre heures (fig. *b*). Les noyaux (*Mn*) ne présentent pas de différences apparentes par rapport au noyau d'une cellule traitée (Pl. I, fig. *a*), alors que les structures, la taille et le nombre des mitochondries (*m*) se modifient ; × 20 000.


m
m
Mn
m
μ
a

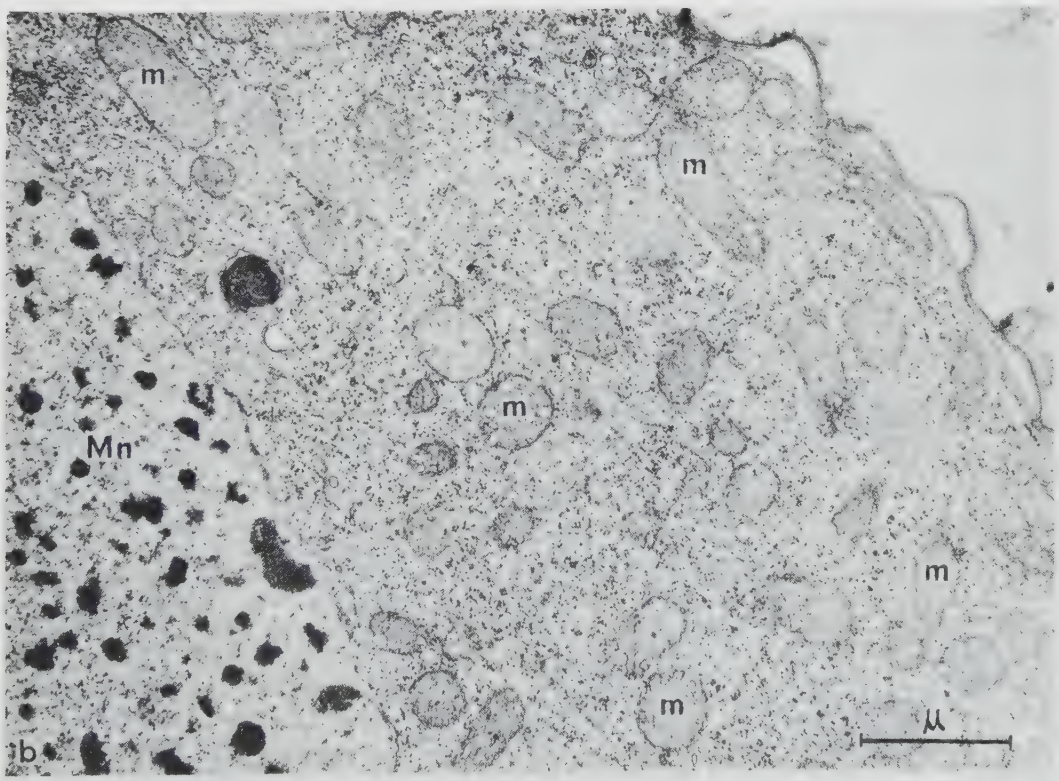
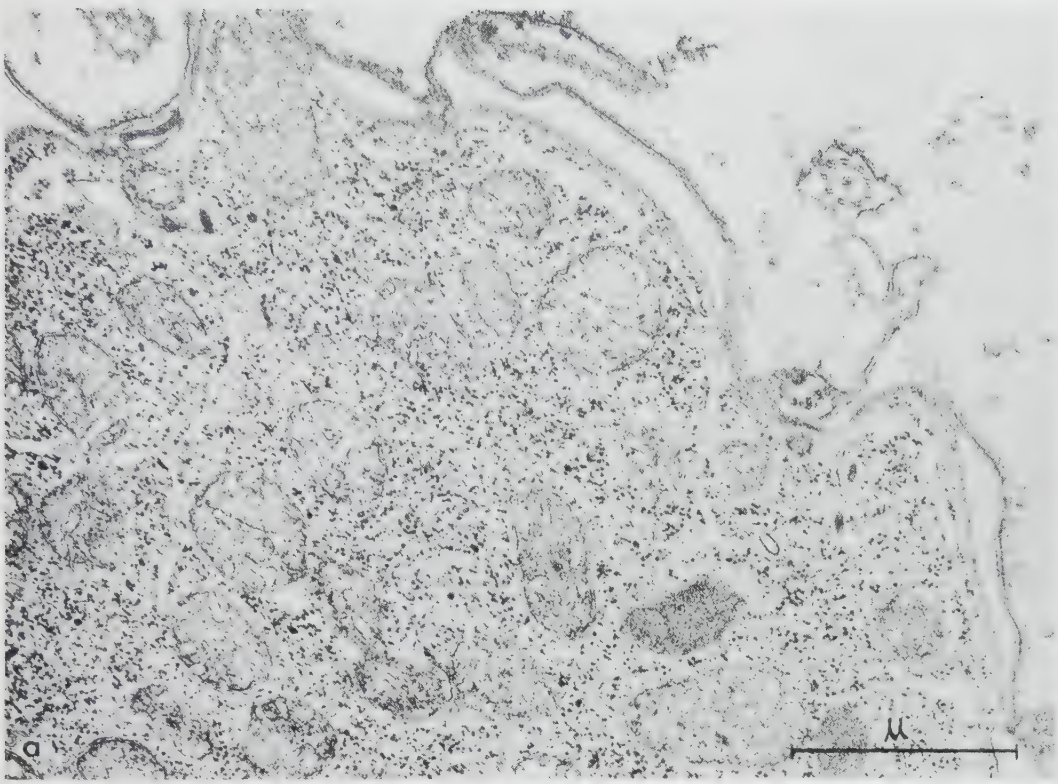

m
m
m
Mn
m
m
μ
b

Planche III

Fig. a et *b.* — Portions de cytoplasme de cellules traitées pendant vingt-quatre heures avec 20 µg/ml (fig. *a*) et 1,5 µg/ml (fig. *b*) de bromure d'éthidium. Les modifications des mitochondries sont semblables dans les deux cas ; × 30 000.


a
μ

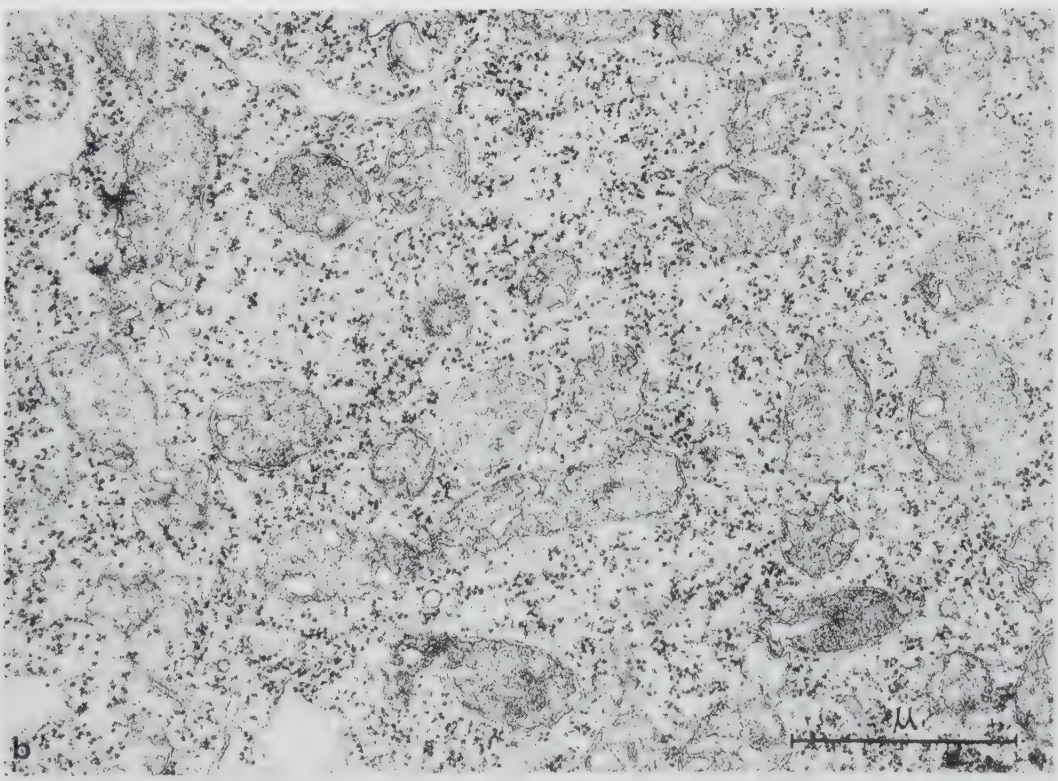
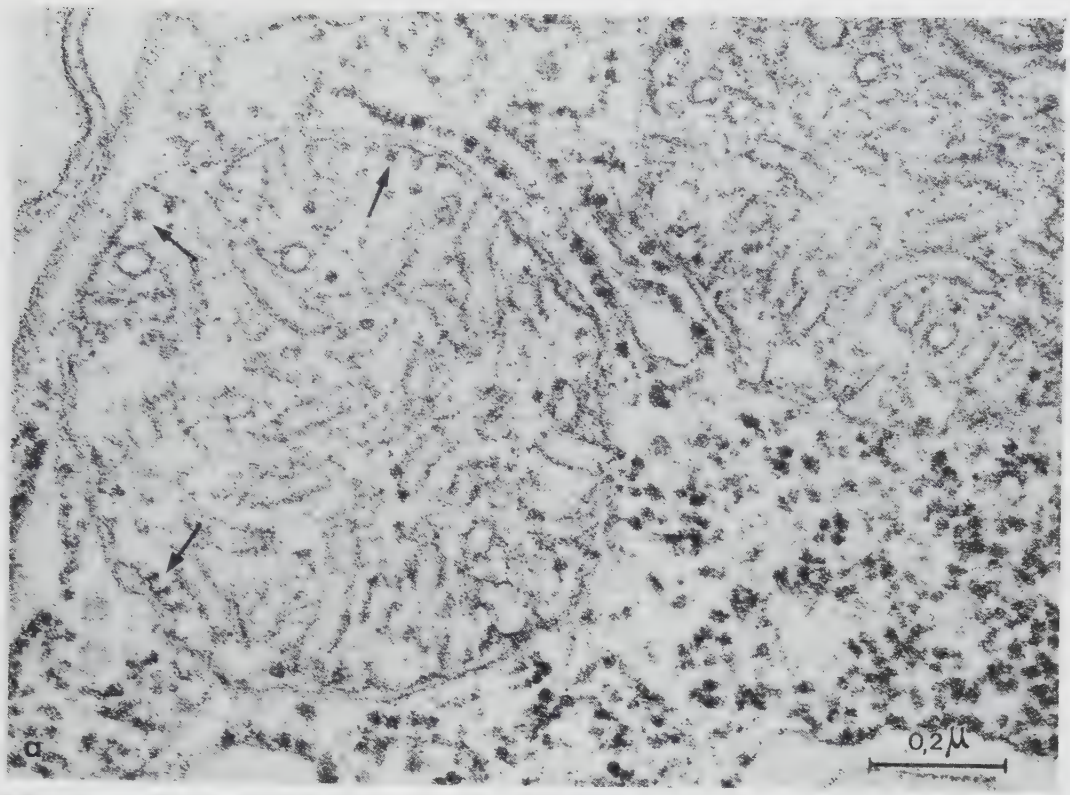

b
μ

Planche IV

Fig. a. — Mitochondrie à crêtes tubulaires d'une cellule d'une culture témoin en phase logarithmique. Les ribosomes (*flèches*) sont visibles à la périphérie de la mitochondrie, accolés à la membrane interne ; × 90 000.

Fig. b. — Mitochondrie d'une cellule d'une culture traitée pendant vingt-quatre heures avec 20 µg/ml de bromure d'éthidium. Les crêtes sont rares. Les ribosomes ont disparu ; × 90 000.


a
0,2 µ

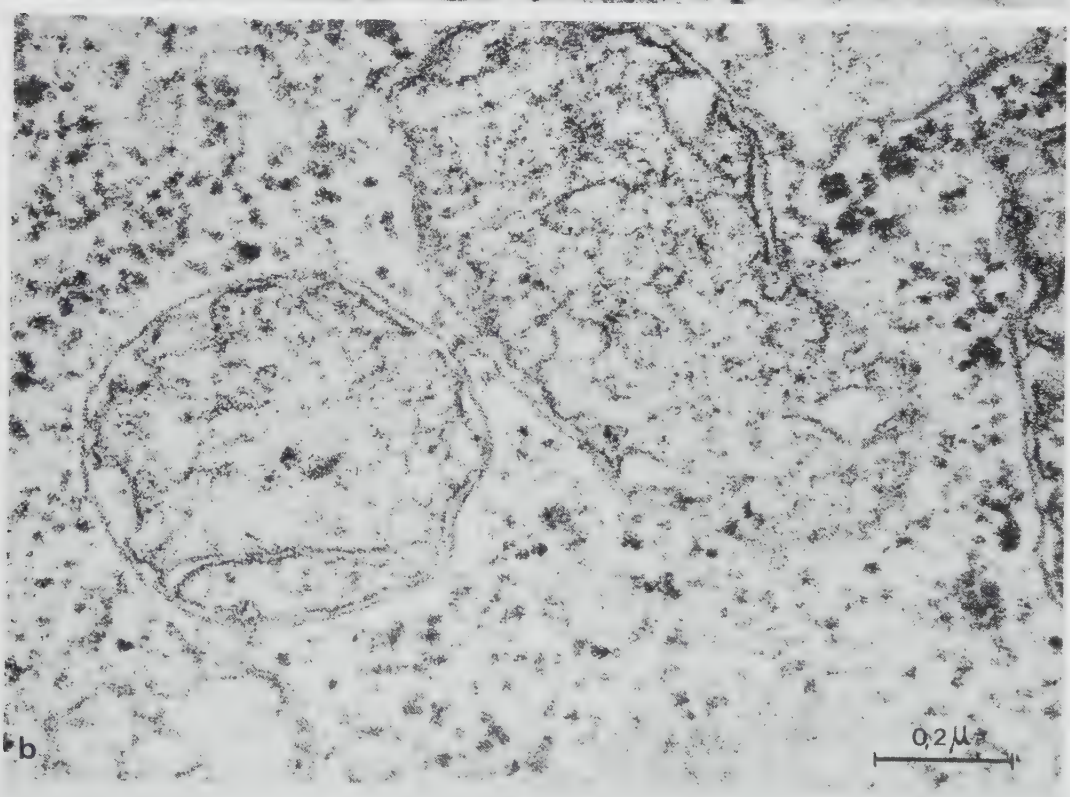

b
0,2 µ

Planche V

Fig. a. — Autoradiographie d'une cellule marquée pendant quatre heures à la thymidine ^{3}H et traitée en même temps avec 20 µg/ml de bromure d'éthidium. Une mitochondrie radioactive (*flèche*) ; × 24 000. Temps d'exposition : cinq semaines.

Fig. b. — Autoradiographie d'une cellule témoin (quatre heures de thymidine ^{3}H sans bromure d'éthidium). Nombreuses mitochondries radioactives. Macronoyau (*Mn*) ; × 24 000. Temps d'exposition : cinq semaines.

a
μ

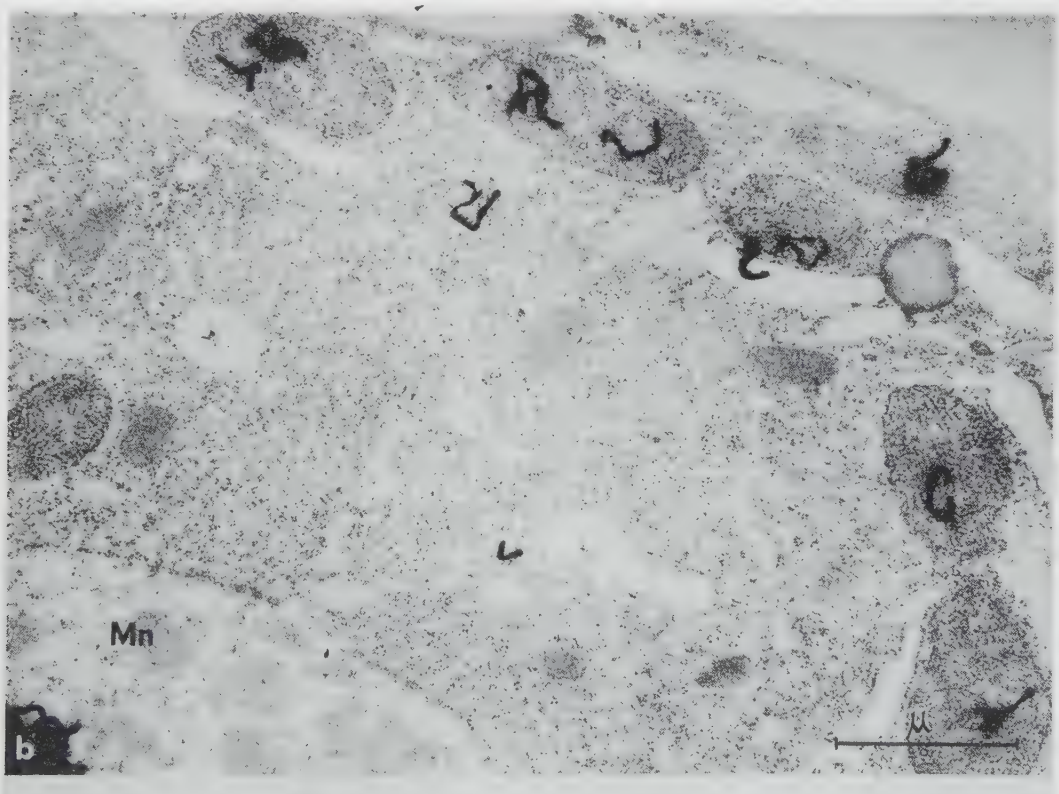
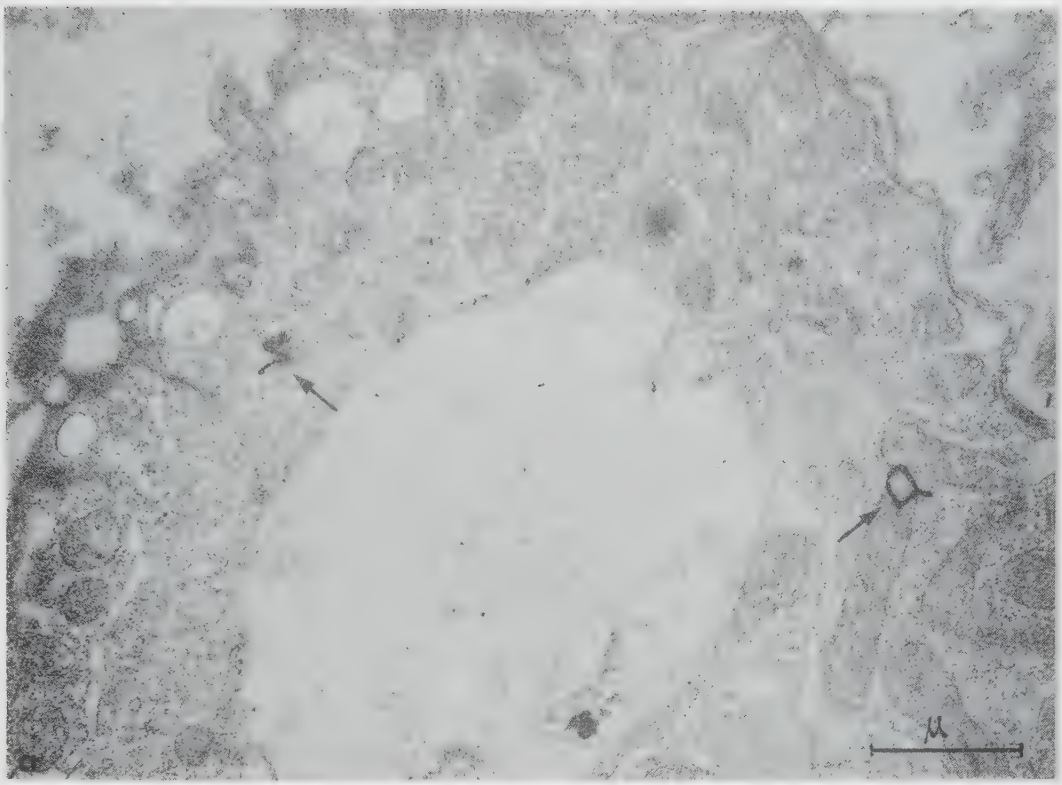
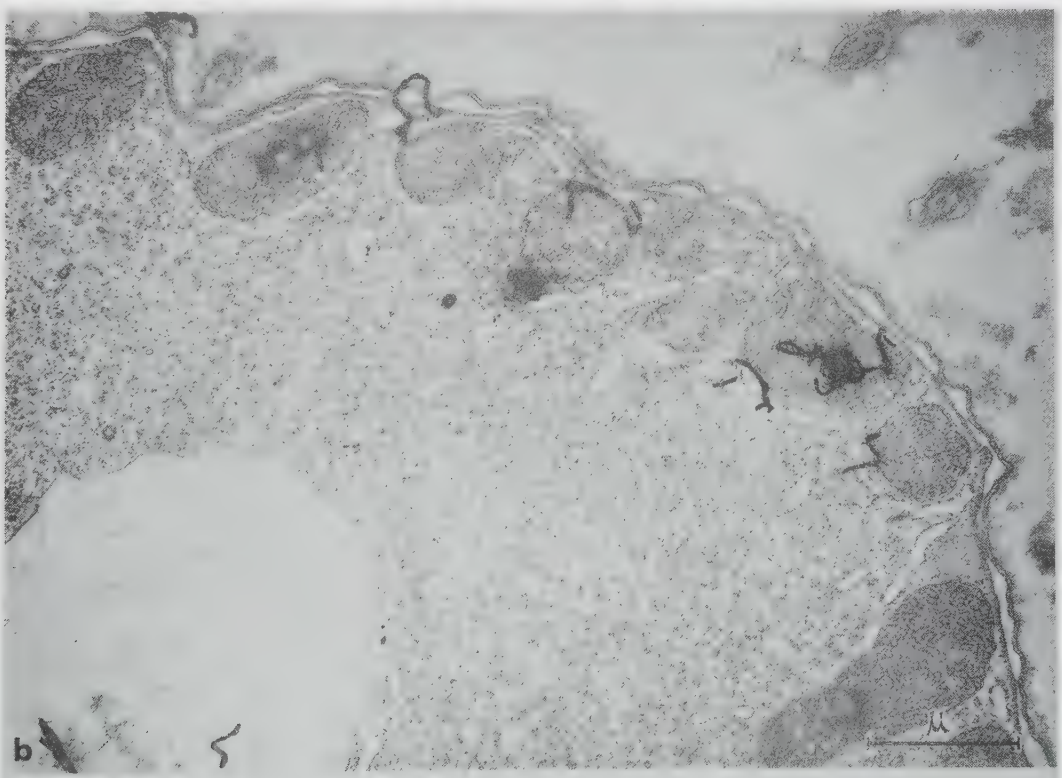

Mn
b
μ

Planche VI

Fig. a. — Autoradiographie d'une cellule marquée pendant douze heures à la thymidine ^{3}H et traitée en même temps avec 20 µg/ml de bromure d'éthidium. Deux mitochondries radioactives (*flèche*) ; × 20 000. Temps d'exposition : cinq semaines.

Fig. b. — Autoradiographie d'une cellule témoin (douze heures de thymidine ^{3}H, mais sans bromure d'éthidium). Nombreuses mitochondries radioactives. Macronoyau (*Mn*) ; × 20 000. Temps d'exposition : cinq semaines.





JOURNAL DE MICROSCOPIE
R. Charret

Planche VI